

Aus der Dermatologischen Klinik und Poliklinik  
der Universität München  
Vorstand: Prof. Dr. Dr. h. c. O. Braun-Falco

**In vitro-Empfindlichkeit von 35 klinischen  
Chlamydia trachomatis Isolaten gegenüber  
Tetrazyklin, Erythromycin, Ciprofloxacin und Ofloxacin**

Dr. rer. nat. Anton Hartinger

Disbui. München

1987





Digitized by the Internet Archive  
in 2026

[https://archive.org/details/IA41554605\\_0007](https://archive.org/details/IA41554605_0007)



Aus der Dermatologischen Klinik und Poliklinik  
der Universität München

Vorstand: Prof. Dr. Dr. h. c. O. Braun-Falco

**In vitro-Empfindlichkeit von 35 klinischen  
Chlamydia trachomatis Isolaten gegenüber  
Tetrazyklin, Erythromycin, Ciprofloxacin und Ofloxacin**

Dissertation zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin an der  
Medizinischen Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität zu  
München

vorgelegt von

**Dr. rer. nat. Anton Hartinger**  
aus München

Jahr  
1987

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät  
der Universität München

Berichterstatter: Priv.Doiz.Dr. H.C.Korting

Mitberichterstatter: Prof.Dr.Dr.h.c.O.Braun-Falco  
PD Dr.L.Gürtler

Dekan: Prof. Dr.Dr.h.c.W.Spann

Tag der mündlichen Prüfung: 03.12.87

## Inhaltsverzeichnis:

### A. Einleitung

I. Die Bedeutung von Chlamydia trachomatis als Krankheitserreger

II. Biologische Eigenschaften

### B. Material und Methoden

#### I. Die Zellkultur

1. Geeignete Zelllinien
2. Propagierung der Zelllinie
3. Trypsinierung von Monolayer Kulturen
  - 3.1 Kontrolle
  - 3.2 Zellpassage
  - 3.3 Reservekulturen
4. Medien und Lösungen
  - 4.1 Physiologische Salzlösung
  - 4.2 Vollmedium
  - 4.3 Transportmedium
  - 4.4 Medium C
  - 4.5 Trypsin EDTA-Lösung
5. Unerwünschte Infektionen

#### II. Isolierung der Chlamydienstämme und Stammhaltung

1. Gewinnung und Verarbeitung der Proben
2. Färbung mit Antikörpern
3. Färbung mit Jod
4. Vermehrung
5. Stammhaltung
6. Candidakontamination und -infektion

### III. Antibiotikatest

1. Verwendete Antibiotika
2. Testdurchführung
3. Auswertung

### C. Ergebnisse

### D. Diskussion

### E. Zusammenfassung

### F. Literaturverzeichnis

## A. Einleitung:

### I. Die Bedeutung von Chlamydia trachomatis als Krankheitserreger

Zahlreiche Untersuchungen belegen die große Bedeutung, die Chlamydia trachomatis als Erreger wichtiger Erkrankungen beim Menschen zukommt (44,50,45).

Je nach geographischer Lage lassen sich zwei grundsätzlich verschiedene Krankheitsbilder unterscheiden. In Ländern mit tropischem Klima und niedrigem Entwicklungsstatus das Trachom: Eine infolge wiederholter Reinfektion bedingte chronische Entzündung der Konjunktiven, die dabei follikelartig wuchern und zu einer mechanischen Schädigung der Cornea führen. Nach Schätzungen der WHO leiden darunter 100 Mill. Menschen. Ein Teil davon erblindet.

In Ländern mit gemäßigttem Klima bevorzugt der Erreger dagegen die Schleimhäute des Urogenitaltraktes. Infektionen der Augenbindehäute sind sehr selten, aber als Neugeborenenkonjunktivitis und als Einschlußkörperchenkonjunktivitis bekannt.

Infektionen der Urethra und der Zervix kommen sehr häufig vor. Das Krankheitsbild der Chlamydieninfektion besitzt alle Merkmale einer sexuell übertragbaren Erkrankung und sieht der Gonorrhoe sehr ähnlich. Deshalb wurden derartige Erkrankungen, bei denen der Erregernachweis mißlang, trotzdem mit dieser in Verbindung gebracht und als nichtgonorrhöische Urethritis bzw. (mucopurulente) Zervizitis bezeichnet. Die häufig vorkommenden Doppelinfektionen erschienen dann infolge unzureichender Therapie (Erregerselektion) als postgonorrhöische Urethritis (PGU) bzw. Zervizitis. Galt die Gonorrhoe bis dato als die häufigste sexuell übertragbare Erkrankung, so stellte die Entdeckung der Chlamydien diese als Ursache von Urethrididen und Zerviziden weit in den Schatten. Vor allem amerikanische (18), englische (35) und schwedische (28), neuerdings auch deutsche Studien (20) beweisen, daß Infektionen mit Chlamydia trachomatis ca. 2-3 mal häufiger zu finden sind als solche mit Neisseria gonorrhoeae. 50-60% der NGU

und 60-80% der PGU konnten auf Infektionen mit Chlamydia trachomatis zurückgeführt werden (45). Immerhin 20 bzw 40% der Erkrankungen bleiben weiterhin ohne spezifischen Erregernachweis.

Nicht nur als häufigste Ursache der Urethritis bzw. Zervizitis konnte Chlamydia trachomatis ausgemacht werden, auch für eine Reihe von Komplikationen, die im Rahmen einer "aufsteigenden Infektion" auftreten, konnte der Erreger verantwortlich gemacht werden. Die Entzündung der männlichen Adnexe (Samenblasen, Nebenhoden), sowie der weiblichen (insbes. Eileiter) sind größtenteils chlamydienbedingte Folgeerkrankungen. Sie sind gefürchtet, weil sie in beiden Geschlechtern zu Sterilität führen können. Infektionen der weiblichen Adnexe (Salpingitis) können sich im kleinen Becken (Pelvic inflammatory disease, PID) und darüber hinaus im gesamten Abdomen ausbreiten und zu Perihepatitis führen (Fitz-Hugh-Curtis-Syndrom).

Neben der Gefahr der "aufsteigenden Infektion" für die Mutter stellt bei Gravidität die infizierte Zervix auch eine Gefährdung des Neugeborenen dar. Die Neugeborenen-Blennorrhoe ist mittlerweile häufiger durch Chlamydien verursacht als durch Neisseria gonorrhoeae. Darüber hinaus kann sich über eine Besiedlung des Nasen-Rachenraumes beim Säugling eine gefürchtete Pneumonie entwickeln.

Der Vollständigkeit halber sei auf das Krankheitsbild des Lymphogranuloma venereum hingewiesen, welches ebenfalls auf eine Infektion mit Chlamydia trachomatis zurückgeführt werden kann und zu eitriger Abszedierung in den Lymphknoten der Leistengegend führt. Im Vergleich zu den anderen Krankheitsbildern ist es jedoch vergleichsweise selten. Auch scheint sich der Erreger des Lymphogranuloma venereum geringfügig (Serogruppe L<sub>1</sub>, L<sub>2</sub>, L<sub>3</sub>, hohe Invasivität, "schnell wachsende LGV-Stämme") von dem Erreger des Trachoms und der Urethritis ("langsam wachsende" TRIC-Stämme) zu unterscheiden. Letztere sind, obwohl sie unterschiedlichen Serogruppen angehören können (Serogruppen A-K), aber ansonsten völlig identisch.

## II. Biologische Eigenschaften

Auf Grund des ungewöhnlichen Vermehrungszyklus, der eng mit eukaryontischen Zellen verknüpft ist (s. Abb.1) und dem Zellparasitismus der Viren ähnelt, wurden Chlamydien lange Zeit als "große Viren" bezeichnet. Eine Reihe von Merkmalen jedoch (z.B. der Besitz einer eigenen DNA, Ribosomen, Empfindlichkeit gegenüber Antibiotika) zeigen eindeutig ihre Zugehörigkeit zum Reich der Bakterien (46).

Elektronenmikroskopische Analysen der Zellwand weisen sie als gramnegative Bakterien aus. Im Wechselspiel zwischen Vermehrung, Ausbreitung und Infektion entwickelte der Erreger einen einzigartigen Entwicklungszyklus, der ausschließlich innerhalb einer membranumschlossenen Vakuole im Zytoplasma einer Wirtszelle abläuft. Innerhalb dieser Vakuole vermehrt sich der in dieser Form als Reticularkörper bezeichnete Erreger (Größe 0.6-1.5  $\mu$ ) durch Zweiteilung ganz nach Art der Bakterien. In diesem Zustand ist er nicht infektiös, durch mechanische Irritationen verletzlich und empfindlich gegenüber einer Reihe von Antibiotika. Diese Vermehrungsphase beginnt bereits Stunden nach der Aufnahme in die Wirtszelle (Infektion) und dauert 20-30 Stunden. Noch während der Teilungsphase beginnen sich die ersten Partikel umzuwandeln in eine Dauerform, die Elementarkörperchen genannt wird. Sie verkleinern sich dabei, ihr Zytoplasma verdickt sich, die Zahl der Ribosomen vermindert sich absolut sowie der Gesamtproteinanteil relativ zugunsten des DNA/RNA Anteils (46). Dieser Prozeß der Reifung, welcher parallel zur Vermehrungsphase bereits anläuft, endet frühestens nach 48-72h. Der Inhalt der Vakuole besteht dann vollständig aus Elementarkörperchen: Der Einschlußkörper ist "reif".

Je nach Stamm und abhängig von den Kulturbedingungen schwankt die Zahl der infektiösen Partikel in der Mikrokolonie zwischen 10 und 500 Individuen pro Einschlußkörper. Nach Ablauf von 72h nimmt die Vakuole noch an Größe zu und platzt dann irgendwann auf, um den Inhalt des Einschlußkörpers freizusetzen. Diese Elementarkörper ( $\varnothing$  0.2-0.4  $\mu$ m) stellen das eigentliche infektiöse Agens von

Chlamydia trachomatis dar. Sie enthalten elektronendichtes Kernmaterial, einige Ribosomen und sind von einer widerstandsfähigen 3-schichtigen Zellwand umgeben. Mit Körpersekreten, an Partikeln, Sperma oder Epithelien haftend, werden sie weitergegeben und können - auf die Epithelien der Schleimhäute des Genitaltraktes oder der Bindehäute des Auges gebracht - neue Zellen infizieren. Elementarkörperchen werden über spezielle Rezeptoren an die Membran geeigneter Schleimhautzellen gebunden und über einen phagozytoseartigen Prozeß ins Zellinnere geschleust. Unmittelbar nach ihrer Aufnahme dort reorganisieren sich die aufgenommenen Elementarkörperchen in Reticularkörper und beginnen sich zu vermehren. Eine Reihe von niedermolekularen Verbindungen, vor allem energiereiche Verbindungen wie z.B. ATP beziehen sie dabei von ihrer Wirtszelle. Die Schädigung der Zellen ist weniger Folge einer direkten toxischen Einwirkung des Parasiten als vielmehr eine Folge von Substanzverarmung und mechanischer Beeinträchtigung.

| Antibiotika mit In vitro- und In vivo-Wirksamkeit auf <u>Chl. trachomatis</u> | Antibiotika mit fraglicher Wirkung | Erwiesenermaßen unwirksame Antibiotika |
|-------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------|----------------------------------------|
| Tetracykline                                                                  | Penizilline                        | Aminoglycoside                         |
| Makrolidantibiotika                                                           | Clindamycin                        | Spectinomycin                          |
| Rifampicin                                                                    | Chloramphenicol                    | Nalidixinsäure                         |
| Sulfonamide                                                                   | Trimethoprim                       | Cephalosporine                         |
| Fluoroquinolone                                                               |                                    | Vancomycin                             |
|                                                                               |                                    | Metronidazol                           |

Tabelle 1: Die Wirksamkeit einzelner Antibiotikaklassen auf Chlamydia trachomatis

Auf Elementarkörperchen, die das Ausdauer-, Verbreitungs- und Infektionsstadium darstellen, ist keinerlei Einflußnahme möglich. Dagegen vermögen eine Reihe von antibiotischen Substanzen die Vermehrungsphase des Chlamydienzyklus zu beeinflussen. Vor allem Verbindungen, die gut ins Innere von Zellen zu penetrieren vermö-

gen und deren Wirkmechanismus nicht auf die Hemmung der Mureinsynthese abzielt, kommen als Wirksubstanzen in Betracht (s. Tab.1).

Zur Therapie von Chlamydieninfektionen kommen derzeit vor allem Antibiotika der Tetracyklingruppe, meist Tetrazyklin-HCl oder Doxyzyklin, in Frage. Beide Substanzen werden oral verabreicht, üblicherweise 4x500 mg/tgl. bzw. 2x100 mg/tgl.. Sie erreichen Wirkspiegel im Blut (4-5 µg/ml) und im Gewebe (2-4 µg/ml) (24), die etwa eine Zehnerpotenz über den MHK- und MBK-Werten für Chlamydia trachomatis liegen. Da unter dieser Therapie gleichzeitig auch Mycoplasmen und Ureaplasmen miterfaßt werden, gilt dieses Regime als Standardtherapieempfehlung für nichtgonorrhoeische Urethritis (8). Die Erfolgsquote wird mit etwa 80% (klinische Heilungsrate) beziffert (40). Nachteilig wirkt sich dabei eine geringe Compliance von Seiten der Patienten infolge der langen Therapiedauer (7-14 Tage), eine Interferenz mit Nahrungsmitteln und eine allerdings eher als gering anzusehende Nebenwirkungsrate aus. Prinzipiell wäre dieses Therapieschema auch zur Behandlung der so häufigen gonorrhoeischen Doppelinfektion ausreichend. Da jedoch bei Neisseria gonorrhoeae die Penizillinresistenz eng mit der Tetracyklinresistenz gekoppelt ist, kommen Tetrazykline als Alternative zur Standardtherapie mit Penizillin nicht in Frage. Doppelinfektionen werden deshalb zuerst mit einer Einmaldosis Penizillin oder gegebenenfalls anderen Mitteln behandelt. Im Anschluß folgt eine 7-tägige Kur mit Tetrazyklinen. Kontraindiziert sind Tetrazykline in der Schwangerschaft. Als Alternative dazu ist in diesem Fall Erythromycin im Einsatz. Bei einer Dosierung von 2x500 mg/tgl. werden Serumwerte über 0.8 µg/ml erreicht (24). Sie liegen damit ebenfalls ca. eine Zehnerpotenz über dem MHK- und MBK-Werten für Chlamydia trachomatis und Mycoplasmen. Die Erfolgsquote für klinische Heilung wird ebenfalls mit 80% angegeben. Als besonderer Nachteil des Erythromycins gilt seine hohe Nebenwirkungsrate. Auch ist die Mitbehandlung einer gleichzeitigen Gonorrhoe praktisch nicht möglich, denn auch die Erythromycinresistenz von N. gonorrhoeae ist an die Penizillinresistenz gekoppelt. Eine gute Wirkung auf Chlamydien besitzt auch Rifampicin. Nach einer Einmaldosis von 600 mg



werden Serumspiegel von 8 µg/ml, die weit über dem MHK- (0.008 µg/ml) und MBK-Werten (0.015 µg/ml) für Chlamydia trachomatis liegen, gemessen. Die Substanz wurde erfolgreich zur lokalen Behandlung des Trachoms eingesetzt. Da Rifampicin aber nicht unproblematisch in der Handhabung ist, wird es derzeit ausschließlich zur Bekämpfung der Tuberkulose verwendet. Bei Infektionen mit Mycoplasmen und N. gonorrhoeae ist es kontraindiziert. Darüber hinaus sind Resistenzentwicklungen bei Chlamydia trachomatis bekannt geworden (23). Als Alternative zu Tetracyclinen und Erythromycin wird von den Centers for Disease Control einzig und allein Sulfomethoxazol angesprochen. 1.0 g der Substanz 2xtgl. über 10 Tage werden als ausreichend für eine nichtgonorrhoeische Urethritis angesehen (8). Gleichzeitige Infektionen mit N. gonorrhoeae bzw. Ureaplasma urealyticum sprechen auf diese Therapie nicht an, da diese gegen Sulfonamide weitgehend resistent sind.

Große Erwartungen werden an die Gyrasehemmer, sowohl bei der Bekämpfung der Gonorrhoe als auch im Hinblick auf die Therapie nichtgonorrhoeischer Infektionen geknüpft. Als Derivate der Nalidixinsäure - chemisch Quinolone - verkörpern sie ein gänzlich neues Wirkprinzip: die Hemmung der bakteriellen Gyrase B und damit der Replikation. Ihr In vitro-Wirksamkeitsspektrum umfaßt grampositive und gramnegative Keime, in vivo steht jedoch die Aktivität gegen gramnegative Keime ganz im Vordergrund: alle Arten der Enterobacteriaceae und der Pseudomonasfamilie. Ungewöhnlich gut ist auch ihre Wirkung auf gramnegative Kokken. MHK-Werte von 0.0015 µg/ml für N. gonorrhoeae (53) veranlaßten prompt klinische Versuche, die recht erfolgreich verliefen. Tegelberg-Stassen et al. (51) sowie Loo et al. (27) konnten bei Gonorrhoe mit einer Einmaldosis von 250 bzw. 500 mg Ciprofloxacin eine Heilungsrate von 100% erreichen, die denen anderer erprobter Therapieverfahren ebenbürtig erscheint. Auch die Wirkung der Gyrasehemmer auf die Erreger der nichtgonorrhoeischen Urethritis wurden überprüft. Fielen die Ergebnisse bei Norfloxacin noch recht enttäuschend aus (7), so sieht es bei den neuen Fluoroquinolonen Ofloxacin und Ciprofloxacin vielversprechend aus, vorausgesetzt eine genügend lange Therapiedauer. Gegenüber Norfloxacin konnte ihre Aktivität wesentlich gesteigert werden. Dies spiegelt sich auch in den MHK-

Werten gegen einige Chlamydia trachomatis Stämme wieder, die bis dato verfügbar waren (s. Tab. 9).

Ziel der vorliegenden Arbeit war es nun, an einer größeren Anzahl eigener frischer klinischer Isolate von Chlamydia trachomatis zum einen die bewährten Antibiotika Tetracyclin und Erythromycin in ihrer Aktivität zu überprüfen, zum anderen aber zwei neue Gyrasehemmer, die sich schon länger oder gerade eben in der klinischen Erprobung befinden, auf ihre In vitro-Wirksamkeit gegen eine größere Anzahl von Chlamydia trachomatis Stämmen zu testen und sie mit der von Tetracyclin und Erythromycin zu vergleichen. Von Interesse war auch das eventuelle Vorkommen resistenter Erreger, wie sie für Erythromycin von Mourad et al. (32) beschrieben wurden.

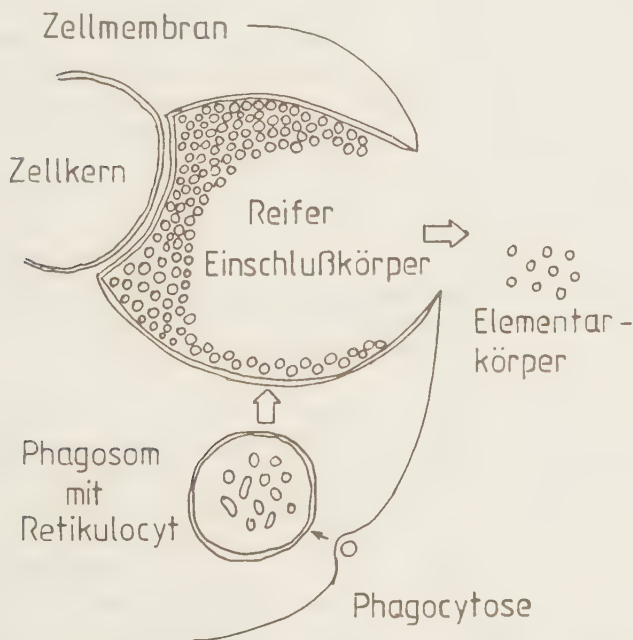


Abb. 1: Entwicklungszyklus von Chlamydia trachomatis

## B. Material und Methoden:

### I. Die Zellkultur

#### 1. Geeignete Zelllinien

Der kulturelle Nachweis von Chlamydia trachomatis ist nur in lebenden Zellen möglich, in denen der Erreger parasitiert und die zu seiner Vermehrung wichtigen Substanzen erhält. Geeignet dafür sind Hühnerembryonen sowie eine Reihe von Zelllinien. Letztere werden auf Grund ihrer einfachen Handhabung nunmehr allgemein bevorzugt. Voraussetzung ist eine genügend hohe Empfindlichkeit der jeweiligen Zelllinie auf Chlamydien. Am bekanntesten und am häufigsten verwendet werden McCoy-Zellen - eine etablierte Zelllinie, d.h. eine Zelllinie mit uneingeschränkter Lebensdauer. Ursprünglich für menschliche Zellen aus Gelenkhautflüssigkeit gehalten, gelten sie nun als Maus-Fibroblasten (L-Zellen). Sie besitzen eine epitheliale Morphologie und zeichnen sich durch problemlose Handhabung sowie eine enorme Teilungsrate aus. Die Zellen wurden von der Fa.Flow, Meckenheim bezogen.

Neben McCoy-Zellen eignen sich auch Hela 229-Zellen, ebenfalls eine Epithelzelllinie oder BHK 21-Zellen (baby hamster kidney cells) gut zur Anzucht von Chlamydien.

#### 2. Propagierung der Zelllinie

Die Zellen wurden ausschließlich in 250 ml Zellkulturflaschen mit 75 cm<sup>2</sup> Bodenfläche (Fa. Nunc, Fa. Greiner, Fa. Falcon) gezogen. Sie wurden täglich auf Wachstum und mögliche Kontamination durch Bakterien, Pilze oder Hefen mittels Invertmikroskop (Diavert Leitz, Wetzlar) kontrolliert. Hatte sich ein geschlossener Monolayer entwickelt und war das Medium verbraucht (Farbumschlag von rot nach gelb), wurden die Zellen gesplittet, d.h. sie wurden enzymatisch (Trypsin, EDTA) von ihrer Unterlage abgelöst, verdünnt und in stark verringerter und definierter Menge mit frischem Medium in neue Kulturgefäße eingesät. Die überschüssigen

Zellen standen zur Chlamydienisolierung zur Verfügung. Auf Grund der hohen Teilungsrate genügte 1/50-1/100 der ursprünglichen Zahl für die Weitervermehrung.

### 3. Trypsinierung von Monolayer Kulturen

#### 3.1 Kontrolle

Vor der Weiterverwendung der jeweiligen Zellkultur wurde jeder Ansatz (Flasche) nach folgenden Kriterien geprüft:

##### a) makroskopisch:

Farbe des Mediums

rot = unverbraucht

rot-gelb = verbraucht

tiefgelb = überaltert

Ist das Medium klar oder trüb?

Löst sich der Zellrasen spontan ab oder haftet er noch fest?

##### b) mikroskopisch:

Aussehen der Zellen bei 100-facher Vergrößerung (Invertmikroskop, Leitz):

konfluenter Zellrasen, Zellen gleichmäßig

oder z.T. in Suspension und "leidend"

Kontamination: Pilzhyphen, Hefen, Bakterien

Nur gesunde Zellen wurden weiterverwendet. Waren die Zellen geschädigt, so wurden in Flüssigstickstoff aufbewahrte Reservezellen aufgetaut und neu ausgesät.

#### 3.2 Zellpassage

Das verbrauchte Medium wurde aus dem Kulturgefäß in eine Vorlage abgegossen. Der Zellrasen wurde dann mit ca. 40 ml Earles Lösung (ohne  $\text{Ca}^{2+}$  und  $\text{Mg}^{2+}$ ) überschichtet. Die Lösung wurde nach einer Minute abgegossen und die Zellen mit 20-30 ml Trypsin-EDTA-Lösung (1:10 mit Earles Lösung verdünnt) überschichtet, der Deckel auf-

gesetzt und die Flaschen mehrmals leicht geschwenkt. Danach wurde der Überstand abgegossen und der Zellrasen mit etwa 5-10 ml der gleichen Flüssigkeit erneut überschichtet. Der Deckel wurde festgeschraubt und die Flaschen für 2 min. im Brutschrank inkubiert (37°C). Nun sollte sich der Zellrasen vom Rand her zu lösen beginnen. Kräftiges Schütteln führte zur vollkommenen Ablösung. Gegebenenfalls mußte nochmals bebrütet werden und auch mehr Trypsin-EDTA-Lösung zugegeben werden. Um nach dem Ablösen der Zellen die Wirkung von Trypsin und EDTA zu neutralisieren, wurden etwa 5 ml Vollmedium zugegeben. Die Flaschen wurden dann verschlossen und nochmals kräftig geschüttelt, um die restlichen Zellverbände aufzulösen und Einzelzellen zu erhalten. Die Suspension wurde nun in sterile, verschließbare 10 ml Röhrchen umgefüllt und 5 min bei 600 x g zentrifugiert. Die Zellen sedimentierten dabei locker am Boden des Gefäßes. Der klare Überstand wurde abgegossen. Mit 2-3 ml Vollmedium wurde das Zellsediment resuspendiert, wobei es mit einer Pasteur-Pipette solange kräftig durchmischt wurde, bis eine homogene Suspension entstand. Von dieser Suspension wurden 1-10 Tropfen (0.05-0.5 ml) in ein neues Kulturgefäß gegeben, mit 50 ml Vollmedium verdünnt und bei 37°C weiterbebrütet. Innerhalb weniger Stunden setzten sich die Zellen ab, hafteten am Boden des Gefäßes an und begannen sich zu strecken (fibroblastenartig), zu teilen und zu vermehren, bis sie wieder einen zusammenhängenden Zellverband hergestellt hatten. Sobald sie kontaktierten, rundeten sie sich ab (epithelartig) und lösten sich zum Teil auch von der Unterlage. Die Zeitdauer, die benötigt wird, um einen neuen Monolayer zu erhalten ist abhängig von der Einsaatdichte. Sie kann 24 Std. oder auch 4 Wochen betragen. Es wurde ein wöchentlicher Turnus angestrebt.

Der Rest der Zellsuspension wurde mit Vollmedium auf eine Zelldichte von  $2-3 \times 10^5$  Zellen/ml verdünnt (Kontrolle in der Zählkammer). 1.5 ml der verdünnten Zellsuspension wurde jeweils in sterile Flachbodenröhrchen (Fa.Greiner, PS-Röhrchen glasklar mit Griffstopfen Nr. 175112) gefüllt, mit abgeflammter Pinzette ein ebenfalls steriles Deckgläschen ( $\varnothing$  12 mm) zugegeben und bei 37°C bebrütet. Infolge der hohen Einsaatdichte lagern sich die Zellen innerhalb von 24 Std. auf dem Deckgläschen ab und bilden darauf

einen eben konfluierenden Zellrasen. Diese Deckglaskulturen eignen sich nun zur Anzucht von Chlamydia trachomatis. Bei der Verarbeitung sehr großer Probenzahlen (>100) wurde die Handhabung einzelner Flachbodenröhrchen allerdings unverhältnismäßig zeit-aufwendig. Die Zellkulturen werden dann besser in Multischalen oder in Mikrotiterplatten angesetzt.

Auf Multischalen (Fa. Greiner) sind 24 Vertiefungen (pro Vertiefung 1.6-1.7 cm) pro Platte angebracht. Sie werden mit 2 ml Zellsuspension beimpft. Da das Material der Platten zellkulturbehandelt ist, können die Zellen wahlweise unmittelbar am Boden der Vertiefung oder auf einem Deckgläschen (Ø 15 mm) gezogen werden. Zur Beurteilung wurden beide Methoden getestet. Die Deckglas-methode erwies sich für die mikroskopische Auswertung als vorteilhaft.

Auf Mikrotiterplatten (Fa. Greiner) sind 96 Vertiefungen (F-Form) pro Platte angebracht. Sie wurden mit je 0.2 ml der Zellsuspension beimpft. Die Zelldichte sollte hier etwas höher sein ( $4 \times 10^5$  Zellen/ml). Die Zellen haften unmittelbar am flachen Boden jeder Vertiefung und werden wie bei Multischalen durch den Boden hindurch beurteilt. Leider erlaubt die Bodendicke nur die Benutzung von Objektiven mit langer Brennweite (Leitz L 25/0.35). Auch erfordern die geringe Größe und die große Anzahl der Vertiefungen hohe Konzentration bei der Bearbeitung. Die Gefahr der Kreuzkontamination ist besonders groß.

Beide Plattentypen werden mit einem Deckel verschlossen, der den Luftaustausch ungehindert erlaubt. Um einen pH von 7,4 zu erhalten, müssen die Kulturen in 5%iger CO<sub>2</sub> Atmosphäre gehalten werden. Für die Anzucht dieser Kulturen wurde deshalb nur Medium A (Bicarbonat gepuffert, s. 4.2) verwendet.

### 3.3 Reservekulturen

Da Zellkulturen auf unterschiedliche Art und Weise Schaden nehmen können (z.B. Infektionen, ungeeignete Arbeitsmethoden) und dann meist irreversibel geschädigt werden, ist es notwendig, Ersatz

bereit zu halten. Eine Möglichkeit sind unabhängig geführte Parallelkulturen. Da auch diese Methode nicht gänzlich sicher ist, werden üblicherweise Reservekulturen in flüssigem Stickstoff aufbewahrt.

Dazu wurden die Zellen nach dem Trypsinieren wie üblich zentrifugiert. Das Zellsediment wurde in Vollmedium, welches 20% (V/V) fetales Kälberserum (FCS) enthält, resuspendiert und auf eine Zelldichte von ca.  $4 \times 10^6$  Zellen/ml verdünnt. Diese Suspension wurde in Eiswasser auf  $0^{\circ}\text{C}$  abgekühlt. Dann wurde Dimethylsulfoxid (DMSO) bis zu einer Endkonzentration von 10% zupipettiert und intensiv gemischt. Von dieser Suspension wurden nun jeweils 2 ml in spezielle, zum Tiefgefrieren geeignete Röhrchen (Nunc Cryotubes) abgefüllt und diese etwa 1 Std. noch bei  $0^{\circ}\text{C}$  im Eis aufbewahrt. Dann wurden die Röhrchen zusammen mit etwas Eis in eine Polystyrol-Box, die eine Wandstärke von mindestens 5 cm besaß, gefüllt. Die verschlossene Box wurde für 12 Std. in einen  $-70^{\circ}\text{C}$  Tiefkühlschrank verbracht. Damit erzielte man die zum Einfrieren von Zellmaterial nötige Abkühlrate von  $1^{\circ}\text{C}/\text{min}$ . Anschließend wurden die Röhrchen in flüssigen Stickstoff überführt. Unter diesen Bedingungen ( $-196^{\circ}\text{C}$ ) sind Zellkulturen jahrelang haltbar.

Aufgetaut sollten Zellen möglichst schnell werden, am besten unter fließendem Wasser. Vor dem Öffnen wurden die Ampullen sorgfältig gereinigt. Der Inhalt wurde dann in ein steriles 10 ml Zentrifugenröhrchen überführt und 5 min bei  $600 \times g$  zentrifugiert, um cytotoxisches DMSO zu entfernen. Das Sediment wurde in Vollmedium resuspendiert und in Zellkulturflaschen ausgesät. Es bewährte sich, diese Kulturen für ein paar Tage im  $\text{CO}_2$ -Schrank bei 5-7%  $\text{CO}_2$  zu bebrüten und bereits 24 Std. nach Aussaat das Medium zu wechseln.

#### 4. Medien und Lösungen

##### 4.1 Earles physiologische Salzlösung, ohne $\text{Ca}^{2+}$ und $\text{Mg}^{2+}$ .

Diese Lösung ist einer phosphatgepufferten Kochsalzlösung (PBS) gleichwertig ( $\text{Ca}^{2+}$  und  $\text{Mg}^{2+}$  frei).

#### 4.2 Vollmedium

##### a) Medium A

|                                                    |        |
|----------------------------------------------------|--------|
| Minimal Essential Medium mit Earles Salzen (EMEM), |        |
| mit 0.85 g/l Na-bicarbonat, ohne L-Glutamin        | 500 ml |
| Fetales Kälberserum                                | 50 ml  |
| L-Glutamin (200 mM)                                | 5 ml   |
| Nichtessentielle Aminosäuren, sterilfiltriert      | 5 ml   |
| Gentamycin 10 mg/ml                                | 1 ml   |

Bicarbonat gepuffertes Medium ist zur Zellkultur im CO<sub>2</sub>-Schrank geeignet.

##### b) Medium B

|                                                    |        |
|----------------------------------------------------|--------|
| Minimal Essential Medium mit Earles Salzen (EMEM), |        |
| mit 20 mM HEPES-Puffer, ohne L-Glutamin            | 500 ml |
| Kälberserum von Neugeborenen                       | 50 ml  |
| L-Glutamin (200 mM)                                | 5 ml   |
| Nichtessentielle Aminosäuren, sterilfiltriert      | 5 ml   |
| Gentamycin (10 mg/ml)                              | 1 ml   |

HEPES gepuffertes Medium eignet sich zur Kultur ohne CO<sub>2</sub>.  
Die Kontaminationsgefahr ist geringer.

Vollmedium wurde aus Medium A und Medium B zu gleichen Teilen zusammengemischt.

#### 4.3 Transportmedium

|                                              |          |        |
|----------------------------------------------|----------|--------|
| Medium B                                     |          | 100 ml |
| Vancomycin HCl (Lilly, 100 mg/ml)            | 1 Trpf.= | 50 µl  |
| Amphotericin B (Fungizone Squibb, 250 µg/ml) |          | 1 ml   |

Das Transportmedium wurde zu je 1.5 ml in Flachbodenröhrchen abgefüllt (ohne Deckglas) und bei -20°C aufbewahrt.

#### 4.4 Medium C

ohne Antibiotikazusatz

|                                         |        |
|-----------------------------------------|--------|
| EMEM (HEPES gepuffert, ohne L-Glutamin) | 500 ml |
|-----------------------------------------|--------|

|                     |       |
|---------------------|-------|
| Fetales Kälberserum | 50 ml |
|---------------------|-------|

|                     |      |
|---------------------|------|
| L-Glutamin (200 mM) | 5 ml |
|---------------------|------|

|                                               |      |
|-----------------------------------------------|------|
| Nichtessentielle Aminosäuren, sterilfiltriert | 5 ml |
|-----------------------------------------------|------|

Medium C diene zum Test der Antibiotikaempfindlichkeit von Chlamydia trachomatis.

#### 4.5 Trypsin EDTA -Lösung

Die Lösung stellt ein Gemisch von 0.05% (W/V) Trypsin (1:250) und 0.02% (W/V) EDTA in einer speziellen Salzlösung dar. Sie wurde in 5 ml Portionen steril abgefüllt und bei -20°C aufbewahrt. Vor Gebrauch wurde die Lösung aufgetaut und mit Earles Salzlösung 1:10 verdünnt.

### 5. Unerwünschte Infektionen

Infektionen in Zellkulturen stellen ein häufiges und gefürchtetes Problem dar, da sich Zellkulturen im Gegensatz zu Bakterienkulturen nicht wieder säubern lassen. Eine manifeste Infektion führt in der Regel zum Verlust der jeweiligen Kultur. Aus diesem Grund müssen, um die Kontaminationsgefahr so gering wie möglich zu halten, alle Arbeiten mit Zellen in einer Sterilbank (Laminar Air Flow) ausgeführt werden. Zusätzlich enthält das Standardvollmedium einen Zusatz von Antibiotika - in diesem Fall Gentamycin. Mit Rücksicht auf eine mögliche Nebenwirkung auf Chlamydien wurde die Konzentration an der unteren Grenze gewählt (20 µg/ml). Sie kann aber ohne Nachteil für die Zellkultur verzehnfacht werden. Chlamydienisolate, die mit Enterokokken oder Streptokokken kontaminiert sind, können mit Vancomycin (50 µg/ml) behandelt werden. Ein besonderes Problem stellen Infektionen mit Hefen dar. Sie können über ungenügend oder nicht sterilisierte Arbeitsgeräte (Pipetten, Gläser), über kontaminierte Luft, unsteriles Arbeiten, aber auch über das Abstrichmaterial in die Kulturen gelangen. Durch Zugabe von Amphotericin B lassen sie sich eine Weile,

zumindest für die Versuchsdauer, unterdrücken, jedoch nicht vollkommen entfernen. Am besten werden verunreinigte Kulturen durch neue ersetzt. Anders verhält es sich mit Mycoplasmeninfektion. Sie geraten meist über sterilfiltrierte Lösung in die Zellkultur. Sterilfilter, obwohl bakterien dicht, vermögen diese Keime aber nicht zurückzuhalten. Eine Mycoplasmeninfektion, meist mit M. hyorhinis, verläuft latent und läßt sich nur mit besonderen Färbemethoden nachweisen. Sie beeinträchtigt in erster Linie Vitalität und makroskopisches Erscheinungsbild der Zellen, tötet sie aber nicht ab. Die Zellen erscheinen "leidend", lösen sich oft spontan von der Unterlage und wachsen mit verminderter Teilungsrate. Die Zellen behalten jedoch ihre Empfindlichkeit für Chlamydien. Es gibt zwar Verfahren, um mit Mykoplasmen verunreinigte Zellkulturen zu kurieren, jedoch lohnt die aufwendige Methode nur bei sehr kostbaren und seltenen Zelllinien. Im Falle von verunreinigten McCoy Zellen wurden einfach Ersatzkulturen aus flüssigem Stickstoff genommen.

## II. Isolierung der Chlamydienstämme und Stammhaltung

### 1. Gewinnung und Verarbeitung der Proben

Das Probenmaterial zur Chlamydienisolierung entstammte folgenden Quellen:

Dermatologische Klinik der Universität München

Urologische Abteilung des Krankenhauses München Bogenhausen

Gynäkologische Abteilung des Krankenhauses München Neuperlach.

Entsprechend der Fachabteilung entstammte das Material von Patienten mit überwiegend dermatologischen, andrologischen, venerologischen (Urethritis, Infertilität), urologischen (Urethritis, Zystitis, Prostatitis, Epididymitis) oder gynäkologischen (Zervicitis, Adnexitis) Problemen. Von Männern wurden in der Regel ein tiefer Harnröhrenabstrich sowie Sekret nach Prostatamassage,

evtl. Ejakulat, von Frauen neben einem Urethralabstrich zusätzlich ein Abstrich der Cervix uteri nach Darstellung mit einem Spekulum entnommen. Bei entsprechender Fragestellung wurden auch Rektalabstriche entnommen. Für die Abstriche wurden Alginattupfer (Calgiswab-Typ I mit dünnem Aluminiumschaft, Fa. Inolex Corp., USA) verwendet. Unmittelbar nach der Probennahme wurde 2-4 cm oberhalb des Tupfermaterials sodann der Schaft des Tupfers mit einer Zange abgetrennt und der restliche Tupfer kopfüber in ein Behältnis mit Transportmedium (Medium B mit Antibiotikazusätzen, in Flachbodenröhrchen) gegeben. Dieses Behältnis mit innenliegendem Proben-tupfer wurde sofort tiefgefroren und bis zum Test bei -70°C gelagert (max. 1 Woche). Im wöchentlichen Turnus wurden diese Proben auf Zellkulturen gebracht, welche sich auf tags-zuvor vorbereiteten Deckgläschen in Flachbodenröhrchen befanden (s.I.3.2). Dazu wurden die Röhrchen nach dem Auftauen etwa 10 sec. mit Hilfe eines Schüttlers (Whirlimix) kräftig durchmischt, um am Tupfer haftendes Abstrichmaterial in Suspension zu bringen. Der Inhalt des Transportmediums wurde dann auf zwei Röhrchen mit Deckglaskulturen verteilt. Die so beimpften Kulturen wurden nun 1 Std. mit 3000 x g bei 37°C zentrifugiert und weitere 3 Std. bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde das überstehende Zellkulturmedium abgegossen und der Zellmonolayer mit frischem Medium B, dem Cycloheximid in einer Konzentration von 1 µg/ml zugesetzt war, überschichtet. Die Kulturen wurden nun für weitere 48 Std. bei 37°C bebrütet.

## 2. Färbung mit Antikörpern

Nach 48 Std. wurde je ein Röhrchen von jedem Doppelansatz auf Wachstum von Chlamydien geprüft. Dazu wurde das Kulturmedium abgegossen und der Monolayer für etwa 10 min. mit 2 ml 96%-igem Methanol überschichtet, um die Zellen so zu fixieren. Danach wurde das Deckgläschen mit einer Pinzette entnommen und mit dem Zellrasen nach oben auf einen gekennzeichneten Objektträger gelegt. Noch bevor aller Alkohol verdunstet war, wurden 20 µl einer Lösung mit Fluorescein-markierten (FITC) monoklonalen Antikörpern (Syva-Merck, Culture confirmation test) zupipettiert und gleichmäßig über den Zellrasen verteilt. Um das Eintrocknen der Färbe-

lösung auf den Zellen zu verhindern, wurden die Objektträger mit Deckgläschen etwa 1/2 Std. bei 37°C in einer feuchten Kammer inkubiert. Danach wurde jedes Deckgläschen mit der Pinzette wieder abgehoben, 10 sec. in dest. Wasser geschwenkt und nun - nachdem die Wasserreste sorgfältig abgetupft worden waren - mit der Zellsseite nach unten in einen Tropfen Glycerin oder Eukitt (Merck, Darmstadt) auf dem nämlichen Objektträger eingebettet. Mit Hilfe des Fluoreszenzmikroskopes wurden die einzelnen Präparate bei 250-facher Vergrößerung (25-fache Objektiv und 10-fache Okularvergrößerung) auf typische, apfelgrün leuchtende Einschlusskörper durchgemustert. Von positiven Proben wurde das entsprechende Röhrchen des Parallelansatzes auf -70°C tiefgefroren und gelagert.

### 3. Jodfärbung

Neben der Färbung mit Fluorescein-markierten Antikörpern wurde gelegentlich auch die Jodfärbung durchgeführt. Sie macht sich den Umstand zu Nutze, daß Chlamydia trachomatis während der Ausreifung der Einschlusskörper Glycogen in die Zellvakuole ablagert, welches sich mit Lugolscher Lösung braun anfärben läßt. Die Deckglaskulturen wurden dazu, nachdem sie mit Methanol fixiert worden waren, mit 1 ml Lugolscher Lösung etwa eine 1/2 Std. inkubiert. Dann wurde die Lösung wieder abgesaugt und die Zellen etwa 1 Std. mit physiologischer Kochsalzlösung inkubiert. Diese Lösung wurde einmal gewechselt. Sodann wurde das Deckplättchen mit den Zellen in ähnlicher Weise wie oben beschrieben auf einem Objektträger fixiert. Mikroskopiert wurde bei etwa 250-facher Vergrößerung im Durchlicht. Positive Einschlüsse erscheinen als mahagonifarbene, rundliche, neben dem Kern liegende Gebilde mit einer granulären Feinstruktur. Obwohl einfacher und billiger in der Durchführung, ist die Methode aber nicht ganz so empfindlich wie die FITC-Antikörperfärbung. Abnormale Einschlüsse werden eher als Artefakte mißdeutet, während echte Artefakte vom Ungeübten leicht als positive Einschlüsse angesehen werden können.

#### 4. Vermehrung

Da sich zeigte, daß auch bei einer Temperatur von  $-70^{\circ}\text{C}$  viele Chlamydia trachomatis Stämme ihre Infektiosität verlieren, wurde versucht, den tiefgefrorenen positiven Parallelansatz möglichst bald über neue Zellkulturpassagen zu vermehren. Dazu wurden in das Röhrchen nach dem Auftauen etwa 10-15 sterile Glaskügelchen ( $\varnothing$  1.5-2 mm) gefüllt und dieses dann, um alle Zellen zu lysieren, auf einem "Whirlimix" ca. 20 sec. kräftig geschüttelt. Der Inhalt wurde auf zwei frische Zellkulturen pipettiert, einzentrifugiert und 48 Std. bebrütet. Dieses Verfahren wurde wiederholt. In der Regel erhielt man nach 3 Passagen eine Reihe hochgradig infizierter Zellkulturen. In diesen hochtitrigen Proben ließ sich die Infektiosität der Chlamydia trachomatis Stämme wesentlich besser konservieren.

#### 5. Stammhaltung

Eine der infizierten Zellkulturen wurde nach dem Ablösen der Zellen mit den Glaskugeln in flüssigem Stickstoff als Reserve aufbewahrt. Die restlichen Röhrchen wurden bei  $-70^{\circ}\text{C}$  im Tiefgefrierschrank gelagert. Diese Proben wurden allerdings alle 2-3 Monate "aufgefrischt", d.h. aufgetaut und auf neue Kulturen gebracht, mikroskopiert und wieder eingefroren.

#### 6. Candidakontamination und -infektion

Als besonderes Problem erwies sich beim Vermehrungsverfahren die Kontamination der Zellkulturen mit Candida. Vermutlich gelangten mit dem Abstrichmaterial geringe Mengen an Hefen in viele Proben. Während der Vermehrungsprozedur wurden diese dann geradezu selektiert und angereichert. Auch Zugabe von Nystatin und später dann Amphotericin B konnte viele dieser Stämme nicht mehr retten. In Gegenwart von Hefen verliert Chlamydia trachomatis offensichtlich seine Infektiosität. Mit Hilfe von Sterilfiltern (Porengröße 0,8  $\mu$ ) konnten jedoch die Elementarkörperchen erfolgreich von den Hefezellen getrennt und so bei vielen Stämmen die Infektiosität

erhalten werden. Dazu wurden die Proben nach dem Auftauen mit Vollmedium auf ein Volumen von 5 ml verdünnt und dann durch einen Einmalfilter (Sartorius Minisart 0.8  $\mu$ ) gepreßt. Mit diesem Ultrafiltrat, in dem sich nun die Elementarkörperchen, nicht aber Candidazellen befanden, wurden die neuen Zellkulturen in der vorher beschriebenen Weise beimpft und kultiviert.

### III. Antibiotikatest

#### 1. Verwendete Antibiotika

Von den 35 Chlamydia trachomatis Isolaten wurden bei folgenden Antibiotika die jeweiligen In vitro-Empfindlichkeiten bestimmt:

Tetrazyklin-HCl (Sigma Chemie, Deisenhofen)  
Erythromycin Base (Sigma Chemie, Deisenhofen)  
Ofloxacin (Hoechst, Frankfurt a. Main)  
Ciprofloxacin (Bayer, Leverkusen)

Von einem Chlamydia trachomatis Stamm (Stamm 3917) wurde mit folgenden weiteren Antibiotika noch die In vitro-Aktivität überprüft:

Norfloxacin (MSD-Pharma, München)  
Ampicillin (Sigma Chemie, Deisenhofen)  
Penicillin G (Sigma Chemie, Deisenhofen)  
Ceftizoxim (Boehringer Mannheim)

Von allen getesteten Antibiotika wurden zuerst in doppelt destilliertem Wasser eine Stammlösung zubereitet, die jeweils 10 mg/ml Wirksubstanz enthielt.

Ofloxacin wurde entsprechend der Lösungsvorschrift zuerst mit 0.1 N HCl in Lösung gebracht. Nach dem Verdünnen auf das gewünschte Volumen wurde die Lösung mit 0.1 N NaOH neutralisiert.

Die Stammlösung diente als Ausgangspunkt für die weiteren Verdünnungsreihen, die nun mit antibiotikareichem Zellkulturmedium (Medium C mit 1  $\mu$ g/ml Cycloheximid) hergestellt wurden.

Folgende Verdünnungsstufen wurden gewählt:

a) Für Tetrazyklin und Erythromycin ( $\mu\text{g/ml}$ ):

0.01, 0.02, 0.03, 0.04, 0.05, 0.06, 0.07, 0.08, 0.09,  
0.1, 0.2, 0.4, 0.6, 0.8, 1.0, 2.0

b) Für Ofloxacin und Ciprofloxacin ( $\mu\text{g/ml}$ ):

0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5, 0.6, 0.7, 0.8, 0.9,  
1.0, 2.0, 3.0, 4.0, 5.0, 6.0

c) Für Norfloxacin ( $\mu\text{g/ml}$ ):

4.0, 6.0, 8.0, 10.0, 12.0, 14.0, 16.0, 18.0, 20.0, 50.0, 100.0

d) Für Penicillin G, Ampicillin, Ceftizoxim ( $\mu\text{g/ml}$ ):

0.01, 0.1, 1.0, 10.0, 100.0, 1000.0

Für jede Versuchsreihe wurde eine Nullprobe, d.h. ein Ansatz ohne Antibiotikum, mitgeführt. Die Lösungen wurden für jede Versuchsreihe frisch angesetzt. Es wurde immer in einer Sterilbank (Laminar Air Flow) gearbeitet.

## 2. Testdurchführung

Für die Tests wurden die tags zuvor vorbereiteten Zellkulturen mit etwa  $10^4$ - $10^5$  Elementarkörperchen des jeweiligen Teststammes infiziert. Sofort nach dem Einzentrifugieren wurde das antibiotikafreie Zellkulturmedium gegen ein solches mit der jeweiligen Testsubstanz in der entsprechenden Verdünnung ausgetauscht und die Kulturen für 48 Std. bebrütet. Danach wurden die Kulturen fixiert und gefärbt.

Die Bewertung wurde am Fluoreszenzmikroskop (Laborlux 12 Leitz, Wetzlar) vorgenommen. Zur Beurteilung der antimikrobiellen Wirkung der einzelnen Chemotherapeutika wurde auch ein Testansatz herangezogen, der ohne Antibiotikazugabe kultiviert worden war. In der Regel enthielt diese Nullprobe zwischen  $10^3$  und  $10^4$  reife Einschlusskörperchen, d.h. pro Gesichtsfeld konnten 300-400 Einschlusskörperchen gezählt werden, die sich in der FITC-Antikörperfärbung als apfelgrün leuchtende, rundliche, mit einer granulären

Feinstruktur versehene Gebilde präsentierten. Mit steigender Antibiotikakonzentration im Testansatz verringerte sich ihre Zahl bei einer für jedes Antibiotikum typischen Konzentration drastisch. Schließlich verschwanden sie mit weiter zunehmender Konzentration vollkommen. An ihrer Stelle zeigten sich z.T. siegelring-, z.T. netzartige Strukturen (Retikularkörperchen), die mit weiterer Konzentrationszunahme immer kleiner wurden und zuletzt nur noch als diskusförmige Gebilde von Elementarkörpergröße auszumachen waren. Diejenige Konzentration, die zum Verschwinden aller reifen Einschlußkörperchen führt, wurde als minimale Hemmkonzentration (MHK) bezeichnet. Die Konzentration, ab der sich nach 48-stündiger Bebrütung nur noch aus dem Inoculum stammende Elementarkörper nachweisen ließen, wurde als minimale bakterizide Konzentration (MBK) angesehen.

Mit Hilfe der Jodfärbung konnte nur das Verschwinden der Einschlußkörper beobachtet werden. Sie eignet sich deshalb nur zur Ermittlung der MHK. Zur Bestimmung der MBK sind bei dieser Nachweismethode Subkulturen unerlässlich.

### 3. Auswertung

Die Auswertung erfolgte semiquantitativ nach einer 10-stufigen Bewertungsskala, wobei der Infektionsgrad der Nullprobe als Bewertungsgrundlage genommen wurde. In der Regel wurde jede Deckglaskultur mit etwa  $10^5$  Elementarkörperchen beimpft, d.h. von den  $3 \times 10^5$  Zellen des Deckgläschens wurde etwa jede 3.Zelle infiziert. Bei dieser Inoculumgröße entwickeln sich etwa  $10^4$  reife Einschlußkörper pro Deckglas, was etwa 200-400 Einschlußkörpern pro Gesichtsfeld bei 250-facher Gesamtvergrößerung entsprach. Mehrere solcher Gesichtsfelder wurden durchgemustert und der Infektionsgrad bzw. die Menge der reifen Einschlußkörper relativ zur Nullprobe in einem repräsentativen Feld zur Bewertung herangezogen.

Die Anzahl der vorhandenen oder noch vorhandenen Einschlußkörper wurde mit einer Maßzahl zwischen 1 und 10 bewertet. Dabei entsprachen:

| Zahl der Einschlußkörper | Maßzahl |
|--------------------------|---------|
| 300-400                  | 10      |
| 200-300                  | 9       |
| 100-200                  | 8       |
| 50-100                   | 7       |
| 20- 50                   | 6       |
| 10- 20                   | 5       |
| 5- 10                    | 4       |
| 2- 5                     | 3       |
| 1- 2                     | 2       |
| 0- 1                     | 1       |

Für jedes Antibiotikum ergab sich dabei eine typische Reduktionskinetik, d.h. innerhalb eines bestimmten, meist schon sehr niedrigen Konzentrationsbereichs konnte eine drastische Verringerung der Zahl der Einschlußkörper beobachtet werden. Vollkommen verschwanden die Einschlußkörper dann erst bei höheren Konzentrationen an Wirksubstanz. Das Verschwinden der reifen Einschlußkörper markiert die MHK. Bei Konzentrationen größer der MHK bestehen sie jedoch als Vorstufen, d.h. Retikularkörper fort. Mit weiter steigender Antibiotikakonzentration werden aber auch sie mehr und mehr im Wachstum gehemmt. Dabei verringert sich ihr Durchmesser, bis sie bei der Konzentration, die der MBK entspricht, nur noch die Größe der inokulierten Elementarkörper besitzen. Als MBK wurde deshalb die Konzentration bewertet, die jegliches Wachstum der inokulierten Elementarkörper unterdrückte.

## C. Ergebnisse:

Von den 120 Isolaten von Chlamydia trachomatis, die im Rahmen klinischer Untersuchungen gewonnen worden waren, konnten 35 Stämme permanent subkultiviert werden. Bei den restlichen Isolaten gelang zumeist eine Kultur über mehrere Passagen, dann ging jedoch ihre Infektiosität verloren. In ca. der Hälfte der Fälle konnte eine Candidainfektion als Ursache ermittelt werden. Mit Hilfe von Ultrafiltern gelang es in einigen Fällen, die Hefen wieder aus der Kultur zu eliminieren. In den restlichen Fällen handelte es sich meist um geringgradig infizierte Zellkulturen, in denen die Infektiosität schon innerhalb von Wochen verloren ging. Hochgradig infizierte Zellkulturen, bei -70° aufbewahrt, erwiesen sich für die Konservierung von Chlamydia trachomatis Isolaten als vorteilhaft.

In der vorliegenden Arbeit wurden 35 serologisch nicht typisierte, klinische Isolate von Chlamydia trachomatis auf ihre In vitro- Empfindlichkeit gegenüber den Standardchemotherapeutika Tetrazyklin und Erythromycin überprüft. Darüber hinaus wurde ihre Empfindlichkeit gegenüber neueren Substanzen aus der Klasse der Fluoroquinolone (Gyrasehemmer) - Ofloxacin und Ciprofloxacin- bestimmt. Von einem Stamm (3917) wurden auch die Empfindlichkeiten gegenüber Norfloxacin, Penicillin G, Ampicillin und Ceftizoxim bestimmt.

### I. MHK- und MBK-Wert für Tetrazyklin und Erythromycin

Für Tetrazyklin und Erythromycin sind die gefundenen MHK- und MBK-Werte in Tabelle 2 und 3 aufgetragen. Abbildung 2 und 3 stellen die Ergebnisse graphisch dar.

| Konz. ( $\mu\text{g/ml}$ ) | Tetrazyklin |      | Erythromycin |      |
|----------------------------|-------------|------|--------------|------|
|                            | n           | %    | n            | %    |
| 0.03                       | 2           | 5.7  | 0            | 0    |
| 0.04                       | 8           | 22.8 | 4            | 11.4 |
| 0.05                       | 20          | 57.1 | 8            | 22.8 |
| 0.06                       | 29          | 82.8 | 15           | 42.8 |
| 0.07                       | 32          | 91.4 | 18           | 51.4 |
| 0.08                       | 35          | 100  | 23           | 65.7 |
| 0.09                       |             |      | 27           | 77.1 |
| 0.1                        |             |      | 32           | 91.4 |
| 0.2                        |             |      | 35           | 100  |

Tab. 2: Anzahl der Chlamydia trachomatis Stämme, die in Abhängigkeit von der Antibiotikakonzentration an der Ausbildung reifer Einschlußkörper (MHK) gehemmt werden.

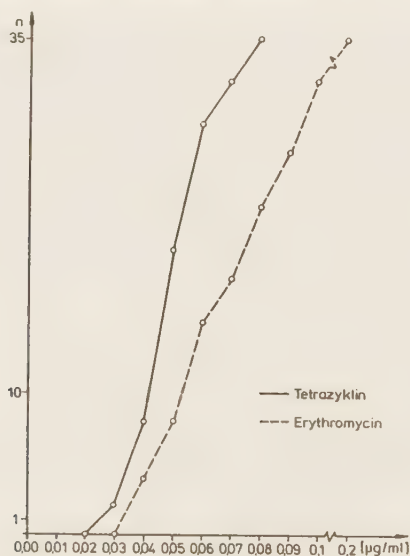


Abb. 2: Anzahl der Chlamydia trachomatis Stämme, die in Abhängigkeit von der Antibiotikakonzentration an der Ausbildung reifer Einschlußkörper gehemmt werden (MHK).

| Konz. ( $\mu\text{g/ml}$ ) | Tetrazyklin |      | Erythromycin |      |
|----------------------------|-------------|------|--------------|------|
|                            | n           | %    | n            | %    |
| 0.1                        | 5           | 14.2 |              |      |
| 0.2                        | 12          | 34.2 | 7            | 20.0 |
| 0.4                        | 17          | 48.5 | 10           | 28.5 |
| 0.6                        | 27          | 77.1 | 14           | 40.0 |
| 0.8                        | 34          | 97.1 | 21           | 60.0 |
| 1.0                        | 35          | 100  | 26           | 74.2 |
| 2.0                        |             |      | 35           | 100  |

Tab. 3: Anzahl der Chlamydia trachomatis Stämme, die in Abhängigkeit von der Antibiotikakonzentration im Wachstum (MBK) gehemmt werden.



Abb.3: Anzahl der Chlamydia trachomatis Stämme, bei denen in Abhängigkeit von der Antibiotikakonzentration jegliches Wachstum unterdrückt wird (MBK).

## II. MHK- und MBK-Werte für Ofloxacin und Ciprofloxacin

Für Ofloxacin und Ciprofloxacin sind die gefundenen MHK- und MBK-Werte in Tabelle 4 und 5 aufgetragen und in Abbildung 4 und 5 dargestellt.

| Konz. (µg/ml) | Ofloxacin |      | Ciprofloxacin |      |
|---------------|-----------|------|---------------|------|
|               | n         | %    | n             | %    |
| 0.5           | 2         | 5.7  |               |      |
| 0.6           | 8         | 22.8 |               |      |
| 0.7           | 19        | 54.2 |               |      |
| 0.8           | 26        | 74.2 |               |      |
| 0.9           | 31        | 88.5 | 5             | 14.2 |
| 1.0           | 34        | 97.1 | 20            | 57.1 |
| 2.0           | 35        | 100  | 35            | 100  |

Tab. 4: Anzahl der Chlamydia trachomatis Stämme, die in Abhängigkeit von der Antibiotikakonzentration in der Ausbildung reifer Einschlußkörper (MHK) gehemmt werden.

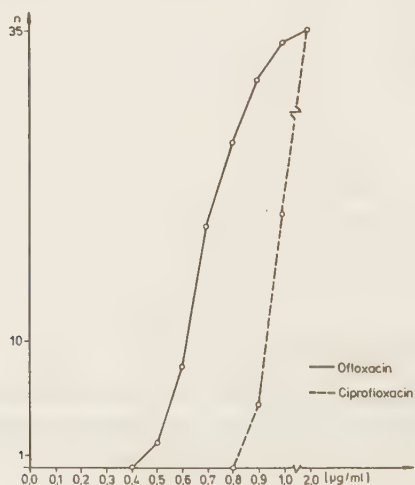


Abb.4: Anzahl der Chlamydia trachomatis Stämme, die in Abhängigkeit von der jeweiligen Antibiotikakonzentration an der Ausbildung reifer Einschlußkörper (MHK) gehemmt werden.

| Konz. ( $\mu\text{g/ml}$ ) | Ofloxacin |      | Ciprofloxacin |      |
|----------------------------|-----------|------|---------------|------|
|                            | n         | %    | n             | %    |
| 1.0                        | 2         | 5.8  |               |      |
| 2.0                        | 8         | 23.5 |               |      |
| 3.0                        | 10        | 29.4 | 5             | 14.2 |
| 4.0                        | 17        | 50.0 | 15            | 42.8 |
| 5.0                        | 25        | 73.5 | 32            | 91.4 |
| 6.0                        | 34        | 100  | 35            | 100  |

Tab. 5: Anzahl der Chlamydia trachomatis Stämme, die in Abhängigkeit von der Antibiotikakonzentration im Wachstum gehemmt werden (MBK).



Abb.5: Anzahl der Chlamydia trachomatis Stämme bei denen in Abhängigkeit von der jeweiligen Antibiotikakonzentration jegliches Wachstum unterdrückt wird (MBK)

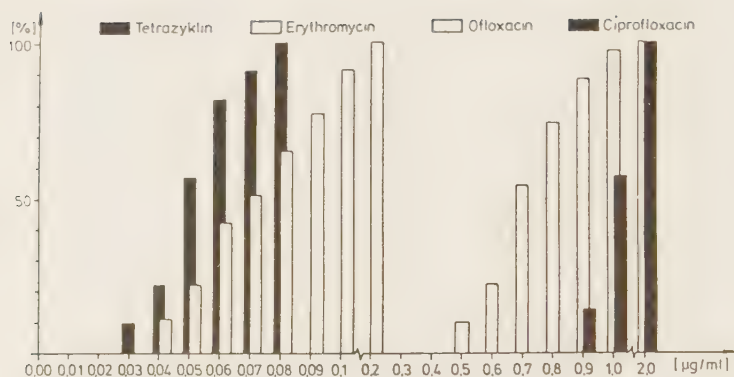


Abb.6: Vergleichende Darstellung der MHK-Werte für Tetrazyklin, Erythromycin, Ofloxacin und Ciprofloxacin.

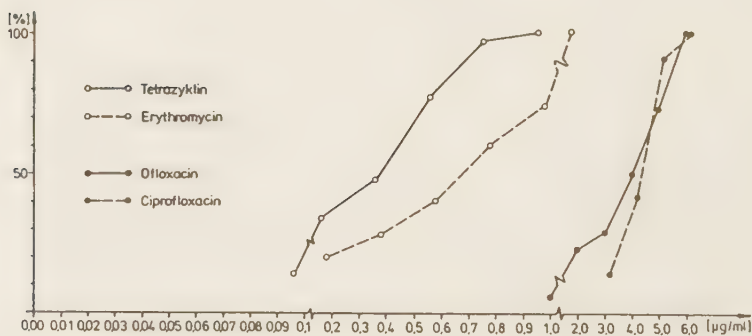


Abb.7: Vergleichende Darstellung der MBK-Werte für Tetrazyklin, Erythromycin, Ofloxacin und Ciprofloxacin.

### III. MHK-Wert für Norfloxacin

Für Norfloxacin wurde ein MHK-Wert von 18 µg/ml für einen Chlamydia trachomatis Stamm gefunden. Ein reproduzierbarer MBK-Wert konnte nicht ermittelt werden.

### IV. MHK-Wert für Penicillin G, Ampicillin und Ceftizoxim

Bereits Konzentrationen von 0.01 µg/ml Penicillin G und Ampicillin reduzierten die Anzahl der Einschlußkörper von Chlamydia trachomatis mit normaler Ausreifung deutlich. Übrig blieben zahlreiche blasig aufgetriebene Gebilde, in denen vereinzelt einschlußkörpertypische Strukturen zu finden waren. Mit steigender Konzentration des Antibiotikums (100 µg und 1000 µg/ml) wurden diese Fehlformen kleiner und ihre Anzahl geringer. Das Wachstum der Retikularkörper wurde aber niemals vollständig unterdrückt. Mit Hilfe von Subkulturen ließ sich die fortbestehende Infektiosität der unvollständig gehemmten Chlamydien nachweisen.

Ceftizoxim zeigte erst bei einer Konzentration von 1000 µg/ml einen hemmenden Effekt auf die Ausreifung von Chlamydia trachomatis. Die Konzentrationsstufen 0.01, 0.1, 1.0, 10.0 und 100.0 blieben ohne jeglichen Einfluß auf die Kulturen.

### V. Reduktionskinetik

In Abb. 8 und 9 wurde für den Stamm 3917 die Abnahme der Einschlußkörper bei steigender Konzentration des Antibiotikums Tetrazyklin bzw. Ofloxacin dargestellt. Bereits bei einer relativ niedrigen und für jedes Antibiotikum typischen Konzentration verringert sich die Anzahl der Einschlußkörper drastisch. Die noch verbleibende geringe Menge an Einschlußkörpern wird dann erst bei Konzentrationen gehemmt, die etwa dem Doppelten der bereits teilweise wirksamen Konzentration entspricht (MHK).



Abb. 8: Reduktion der Einschußkörper bei steigender Konzentration von Tetrazyklin (Stamm 3719)

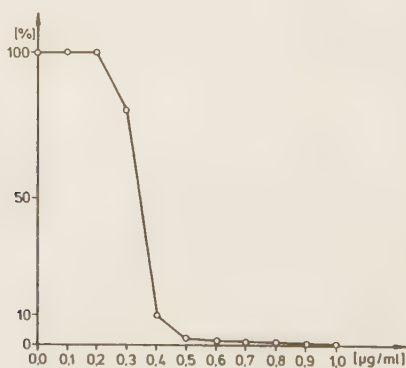


Abb. 9: Reduktion der Einschußkörper bei steigender Konzentration von Ofloxacin (Stamm 3719)

### C. Diskussion:

Die In vitro-Empfindlichkeit mehrerer Chemotherapeutika gegenüber 35 klinischen Isolaten von Chlamydia trachomatis wurde nach der Methode von Ridgway et. al. (37) in Flachbodenröhrchen mit innenliegendem Deckgläschen bestimmt, wobei die verwendeten Zellkulturen allerdings nach Ripa und Mårdh (41) mit Cycloheximid behandelt wurden. Dabei wurden Deckglaszellkulturen mit einer definierten Menge an Elementarkörpern eines Chlamydia trachomatis Stammes infiziert, die Probe einzentrifugiert und anschließend sofort mit Zellmedium inkubiert, welches die jeweilige Testsubstanz in der gewünschten Konzentration enthielt. Nach einer Inkubationszeit von 48-72 Std. wurden die Proben spezifisch angefärbt und mikroskopisch mit Kulturen ohne Testsubstanz verglichen.

Anstatt der sehr aufwendigen Deckglasmethode wurde von verschiedenen Autoren (48,55) die Verwendung von Mikrotiterplatten für die Chlamydienisolierung empfohlen. Die auch für die Empfindlichkeitstests bestehenden Vorteile wie Einsparung von Material und Zeit konnten jedoch die Nachteile der schwierigen Handhabung (Gefahr der Kontamination, Pipettierfehler) und der Auswertung nicht aufwiegen. Für die fluoreszenzmikroskopische Beurteilung mußten nämlich Objektive mit langer Brennweite (z.B. Leitz L 25/0.35) verwendet werden, die infolge mangelnder Lichtausbeute die exakte Beurteilung des Entwicklungsstatus der Einschlußkörper nicht ermöglichten. Bei Verwendung der Jodfärbung waren Kulturen in Mikrotiterplatten akzeptabel auszuwerten. Leider bietet diese Methode andere Nachteile, auf die im Folgenden noch eingegangen wird. Eine gewisse Arbeitserleichterung brachte die Verwendung von Multischalen (24 Loch) in Verbindung mit Deckgläschen anstelle von Flachbodenröhrchen, die jeweils einzeln auf- und zugestöpselt werden mußten.

Zur Auswertung wurden die Kulturen mit einem FITC-markierten monoklonalen Antikörper (Syva-Merck, Darmstadt) angefärbt und nach der Methode von How et. al. (21) ausgewertet. Entsprechend dem Vorschlag ihrer Autoren wurde die MHK einer Substanz als die

Konzentration definiert, die die Ausbildung normaler Einschlußkörper verhindert. Analog dazu stellt die MBK die Konzentration eines Antibiotikums dar, ab der jegliches Wachstum der inokulierten Elementarkörper unterbunden wird und die Entwicklung normaler und abnormaler Einschlußkörper vollkommen unterbleibt. How et al. (21) sprechen sogar von einer "Auslöschung des Antigens" (antigenic extinction). Dieser Eindruck entsteht jedoch nur bei geringer Einsaatdichte an Elementarkörpern ( $10^3$ /Deckglas). Wählt man ein höheres Inoculum (z.B.  $10^4$ - $10^5$ ), so lassen sich sehr wohl die aus dem Inoculum stammenden Elementarkörper ausmachen.

Idealerweise sollten die Werte für MHK und MBK identisch sein. Wie sich jedoch zeigte, bestehen bei allen untersuchten Chemotherapeutika beträchtliche Unterschiede. In der Regel mußten bei den untersuchten Substanzen die minimal inhibitorischen Konzentrationen um 1-2 Zehnerstufen angehoben werden, um bakterizid zu wirken. Einige Verbindungen wirken wohl inhibitorisch, jedoch auch noch so hohe Konzentrationen nicht bakterizid (Penizillin, Ampicillin, Cephalosporine).

Eine Reihe von Autoren benutzte für die Darstellung chlamydialer Einschlußkörper die Anfärbung mit Jodlösung (Lugol) oder Fuchsin (Giemsa). Da sich mit dieser Methode jedoch nur normale reife und z.T. abnormale Einschlußkörper sichtbar machen und beurteilen lassen, können damit auch nur MHK-Werte ermittelt werden. Für die Bestimmung der MBK sind mehrere Subkulturen unerlässlich. Es werden bis zu 10 davon empfohlen (38). Im Gegensatz dazu erlaubt die Verwendung von FITC-markierten Antikörpern die Bestimmung von MHK und MBK in einem Ansatz. Damit lassen sich nicht nur die reifen Stadien des Chlamydienentwicklungszyklus sichtbar machen, sondern praktisch alle Entwicklungsstadien bis hin zum infektiösen Elementarkörper. Über eine Antibiotikawirksamkeit kann damit nicht nur die Aussage Einschlußkörper ja/nein getroffen werden, sondern es kann Schritt für Schritt verfolgt werden, wie mit steigender Konzentration zuerst die normalen Einschlußkörper zwar verschwinden, als typische Retikularkörper oder abnormale Einschlußkörper aber weiterbestehen. Erst bei höheren Konzentrationen sind diese nur noch als ursprüngliche, aus dem Inoculum stammende Elementar-

Tab. 6: MHK- und MBK-Werte für Tetrazyklin und Erythromycin im Vergleich

| Autor              | Jahr | Ref. | Anz. Stämme | Testsubstanz   | MHK (µg/ml) | MBK (µg/ml)                                                  | Färbung |
|--------------------|------|------|-------------|----------------|-------------|--------------------------------------------------------------|---------|
| Ridgway et al.     | 1976 | (37) | 1           | Oxytetracyclin | 0,06        |                                                              | LU      |
|                    |      |      | 1           | Erythromycin   | 0,03        |                                                              | LU      |
| Kuo et al.         | 1977 | (25) | 15          | Tetrazyklin    | 0,02-0,05   |                                                              | GI      |
|                    |      |      | 15          | Erythromycin   | 0,1-0,5     |                                                              | GI      |
| Smith & Washton    | 1978 | (49) | 30          | Tetrazyklin    | 0,1         |                                                              | LU      |
|                    |      |      | 30          | Erythromycin   | 1-2         |                                                              | LU      |
|                    |      |      |             |                |             | 0,125 <sup>1</sup> (4) <sup>2</sup> (250) <sup>3</sup>       | LU      |
| Bowie et al.       | 1978 | (4)  | 1           | Tetrazyklin    | 0,06        |                                                              | LU      |
|                    |      |      | 1           | Doxycyclin     | 0,03        | 0,015 <sup>1</sup> (0,5) <sup>2</sup> (32) <sup>3</sup>      | GI      |
|                    |      |      | 1           | Erythromycin   | 0,25-0,5    | 0,25-0,5 <sup>1</sup> (31) <sup>2</sup> (250) <sup>3</sup>   | GI      |
| Johannisson et al. | 1979 | (22) | 4           | Erythromycin   | 0,5         |                                                              | LU      |
|                    |      |      | 4           | Doxycyclin     | 0,05        |                                                              | LU      |
| Bowie              | 1980 | (5)  | 3           | Erythromycin   | 0,125-0,25  | 0,125 <sup>1</sup> (8-16) <sup>2</sup> (31-125) <sup>3</sup> | GI      |
| Mourad et al.      | 1980 | (32) | 6           | Tetrazyklin    | 0,008-0,015 | 0,03-0,125                                                   | GI      |
|                    |      |      | 6           | Erythromycin   | 0,125-1,0   | 0,5-1,0                                                      | GI      |
| How et al.         | 1985 | (21) | 1           | Oxytetracyclin | 0,062       | 0,50                                                         | IF      |
|                    |      |      | 1           | Erythromycin   | 0,062       | 0,25                                                         | IF      |
| Cevenini et al.    | 1986 | (9)  | 9           | Oxytetracyclin | 0,125-0,5   | 0,5-2,0                                                      | IF      |
|                    |      |      |             |                | 0,06-0,25   | 0,25-1,0                                                     | LU/GI   |
|                    |      |      |             |                | 0,125-0,5   | 0,5-2,0                                                      | IF      |
|                    |      |      | 9           | Erythromycin   | 0,06-0,125  | 0,25-1,0                                                     | LU/GI   |

1) Zugabe von Hemmstoff sofort nach dem Beimpfen;

2) Zugabe von Hemmstoff sofort nach dem Beimpfen, nach 48 Std. Subkultur ohne Hemmstoff;

3) Zugabe von Hemmstoff 48 Std. nach Beimpfen, Weiterbebrüten, dann Subkultur;

körper auszumachen. Die Hemmstoffkonzentration, die jegliches Chlamydienwachstum unterdrückt, kann zu Recht als MBK bezeichnet werden, während das Verschwinden der normalen Einschlusskörper die MHK angibt.

Darüber hinaus ist, wie ein Vergleich der einzelnen Färbemethoden zeigte, die Immunfluoreszenzmethode empfindlicher; dies hatte zur Folge, daß MHK- und MBK-Werte, die damit gemessen wurden, etwa um den Faktor 2 höher ausfielen (9).

Für keines der Antibiotika wurden MHK- und MBK-Werte gefunden, die auf eine Resistenzsteigerung schließen lassen könnten. Bisher wurde solches nur für Erythromycin von Mourad et al.(32) beschrieben. Er konnte 2 Chlamydia trachomatis Stämme isolieren, deren MBK größer als 1 µg/ml war.

Für Tetrazyklin bewegten sich die minimal inhibitorischen Konzentrationen zwischen 0.03 und 0.08, die bakteriziden Konzentrationen zwischen 0.1 und 1.0 µg/ml. Für Erythromycin bewegten sich die entsprechenden Werte zwischen 0.04 und 0.2, bzw. 0.2 und 2.0 µg/ml. Immerhin fanden sich darunter 9 Stämme, die erst ab einer Konzentration von 2 µg/ml vollkommen gehemmt werden. Diese Stämme könnten im Sinne von Mourad et al. (32) als gemäßigt resistent angesehen werden.

Die gefundenen Werte sind mit den Angaben in der Literatur, sofern die gleiche Methodik verwendet wurde, absolut vergleichbar (s. Tab. 6). Die Maximalwerte befinden sich aber am oberen Rand der Skala, wohl infolge des hohen Inoculums. Im übrigen sind manche Daten der Literatur mit Zurückhaltung zu interpretieren. Die meisten Autoren benutzten für den Nachweis Färbemethoden (Lugol, Giemsa), die in ihrer Empfindlichkeit dem Nachweis mit FITC-markierten Antikörpern nachstehen (9, 21). Zur Bestimmung der MBK mußten sie überdies Subkulturen durchführen. Ihre Ergebnisse bewegen sich trotzdem in vergleichbaren Größenordnungen. Bowie et al. (4) diskutierten sehr kritisch die Methode, sofort nach der Inokulation der Zellen mit Chlamydia trachomatis diese mit einem Antibiotikum zu inkubieren. In Abänderung des Verfah-

rens fügten sie Hemmsubstanzen erst 48 Std. nach Infektion der Zellen, also nach Abschluß eines Entwicklungszyklus, hinzu. Ihrer Meinung nach kommt dieses Verfahren der In vivo-Situation mit einer etablierten Infektion am nächsten. Mit dieser Methode fanden sie MBK-Werte, die deutlich höher sind als die im herkömmlichen Verfahren gewonnenen.

|              | MBK (µg/ml) |
|--------------|-------------|
| Tetrazyklin  | 250         |
| Minozyklin   | 2-8         |
| Doxyzyklin   | 16-32       |
| Erythromycin | 250-500     |
| Rifampin     | 16-64       |

Tab. 7: MBK-Werte nach Bowie et al. (4)

Nach Meinung dieser Autoren stellen Minozyklin und Doxyzyklin die Mittel der Wahl zur Therapie chlamydialer Infektionen dar. Erstaunlich schlecht sind die Werte bei Tetrazyklin-HCl und Erythromycin. Ridgway (40) sieht in diesem Verfahren die Bedeutung der Tetrazykline und des Erythromycins unterbewertet.

Zieht man zu MHK- und MBK-Werten zusätzlich pharmakokinetische Daten von Tetrazyklin und Erythromycin in Betracht (s. Tab.8), so versprechen beide Verbindungen zufriedenstellende Therapieerfolge, übertreffen doch die erreichten Serum- und Gewebespiegel die MHK- und MBK-Werte beträchtlich. Tatsächlich sind jedoch nur Heilungsraten von etwa 80% zu erwarten (40) (s.Tab. 9). Die Diskrepanz findet ihre Erklärung möglicherweise weniger in der unzureichenden Empfindlichkeit der Erreger als vielmehr in der mangelnden Compliance einer 7 bis 10-tägigen Antibiotikakur und eine Beeinträchtigung der Antibiotikaresorption im Magen-Darmtrakt durch Nahrungsmittel (Milch und Milchprodukte) und Pharmaka ( $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Al}^{2+}$ ,  $\text{Fe}^{2+}$ , Antacida) (43). Dazu kommt eine beträchtliche Nebenwirkungsrate vor allem bei Erythromycin, die häufig zum Therapieabbruch Anlaß gibt, sowie eine beträchtliche Reinfektionsrate im Verlauf von Behandlung und Nachkontrolle.

Die in Tabelle 9 dargestellten Heilungsraten differieren erheblich. Einige Autoren verbuchen mit ihrem Therapieschema 100 %-ige Erfolge, andere mit ähnlicher Methode verfehlen bei weitem dieses Ziel. Der Grund liegt nicht zuletzt in der unzureichenden Standardisierung und Vergleichbarkeit der Methoden und Bewertungsmaßstäbe. Eindeutigen Kriterien für Erkrankung (subjektive Beschwerden, Leukozytennachweis, Erregernachweis), stehen völlig unzureichend definierte und nicht vergleichbare Kriterien für den Heilerfolg gegenüber.

| Antibiotikum                                      | Serum<br>µg/ml | Gewebe<br>µg/ml | Urin<br>µg/ml | Serum HWZ<br>(Std.) |
|---------------------------------------------------|----------------|-----------------|---------------|---------------------|
| Tetrazyklin<br>4x500 mg/tgl.<br>p.O.              | 4-5            |                 | 300           | 7                   |
| Doxyzyklin<br>2x100 mg/tgl.<br>p.O.               | 4-4.4          | 2.5             |               | 18-22               |
| Erythromycin-<br>stearat<br>2x500 mg/tgl.<br>p.O. | über 0.8       |                 | niedrig       |                     |

Tab. 8: Pharmakologische Daten zu Tetrazyklin und Erythromycin  
(nach Kucers & Bennett (24))

Für Ofloxacin bewegen sich die minimalen inhibitorischen Konzentrationen zwischen 0.5 und 2.0 µg/ml, die minimalen bakteriziden Konzentrationen zwischen 1.0 und 6.0 µg/ml. Die entsprechenden Werte für Ciprofloxacin bewegen sich zwischen 0.9 und 2.0 µg/ml für MHK- und 3.0 und 6.0 µg/ml für MBK-Werte. Insgesamt verhalten sich beide Verbindungen sehr ähnlich, wenngleich Ofloxacin eine etwas bessere Wirksamkeit zeigte als Ciprofloxacin. Die gefundenen Werte entsprechen denen in der Literatur (s.Tab. 10)

Tab. 9: Ergebnisse von Therapiestudien mit Tetrazyklinen und Erythromycin

| Autor                 | Jahr | Ref. | Anz. Pat. | Therapieprotokoll | Kontrolle n. 1-2 Wo.<br>bakt./ klin. Heilung | Kontrolle n. 4-12 Wo.<br>bakt./ klin. Heilung |
|-----------------------|------|------|-----------|-------------------|----------------------------------------------|-----------------------------------------------|
| Johannisson<br>et al. | 1979 | (22) | 57        | Doxycyclin        |                                              |                                               |
|                       |      |      |           | 1x200 mg 1 T.     |                                              |                                               |
|                       |      |      |           | 6x100 mg 7 T.     | 98 %                                         | 84 %                                          |
| McNeil et al.         | 1981 | (33) | 26        | Erythromycin      |                                              |                                               |
|                       |      |      |           | 2x500 mg 10 T.    | 78 %                                         | 87 %                                          |
|                       |      |      |           | Doxycyclin        |                                              |                                               |
| Csango et al.         | 1982 | (10) | 40        | 2x100 mg 10 T.    | 96 %                                         | 88 %                                          |
|                       |      |      |           | Doxycyclin        |                                              |                                               |
|                       |      |      |           | 1x200 mg 1 T.     |                                              | 85 %                                          |
| Lassus et al.         | 1982 | (26) | 61        | 1x100 mg 9 T.     | 98 %                                         | 80 %                                          |
|                       |      |      |           | Erythromycin      |                                              |                                               |
|                       |      |      |           | 2x800 mg 10 T.    | 100 %                                        | 79 %                                          |
| Scheibel et al.       | 1982 | (47) | 34        | Tetrazyklin       |                                              |                                               |
|                       |      |      |           | 4x500 mg 7 T.     | 99 %                                         | 86,4 %                                        |
|                       |      |      |           | 4x250 mg 7 T.     | 100 %                                        | 96,8 %                                        |
| Darne et al.          | 1983 | (11) | 48        | Tetrazyklin       |                                              |                                               |
|                       |      |      |           | Erythromycin      |                                              |                                               |
|                       |      |      |           | 4x250 mg 7 T.     | 100 %                                        | 94 %                                          |
| Hunter et al.         | 1984 | (19) | 157       | 4x250 mg 7 T.     | 100 %                                        | 100 %                                         |
|                       |      |      |           | Erythromycin      |                                              |                                               |
|                       |      |      |           | 2x500 mg 7 T.     | 80 %                                         | 77 %                                          |
|                       |      |      |           | 2x500 mg 14 T.    | 66 %                                         | 96 %                                          |
|                       |      |      |           |                   |                                              | 70 %                                          |

Tab. 10: In vitro-Empfindlichkeit von Chlamydia trachomatis gegen Gyrasehemmer (Vergleich)

| Autor              | Jahr | Ref. | Anz. Stämme | Testsubstanz  | MHK (µ/ml) | MBK (µ/ml) | Färbung |
|--------------------|------|------|-------------|---------------|------------|------------|---------|
| Meier-Ewert et al. | 1983 | (29) | 5           | Norfloxacin   | 5          | 20         | LU      |
| Hart et al.        | 1984 | (16) | 7           | Ciprofloxacin | 0,5-2      |            | GI      |
| Heesen & Muytjens  | 1984 | (17) | 2           | Ciprofloxacin | 0,5-1      | 1-2; 8     | GI      |
|                    |      |      |             | Norfloxacin   | 8-16       | 8-64       | GI      |
| Rumpianesi et al.  | 1984 | (42) | 5           | Ciprofloxacin | 1          | 1          | LU      |
| Ridgway et al.     | 1984 | (39) | 11          | Ciprofloxacin | 1          | 1          | GI/LU   |
|                    |      |      |             | Norfloxacin   | 16         |            | GI/LU   |
| Meier-Ewert et al. | 1984 | ( 0) | 5           | Ciprofloxacin | 1,5        |            | IF      |
| Bailey et al.      | 1984 | (3)  | 1           | Ofoxacin      | 1          |            | IF      |
| Aznar et al.       | 1985 | (2)  | 10          | Ciprofloxacin | 0,5-1      | 0,5-1      | GI      |
|                    |      |      | 10          | Norfloxacin   | 16         | 16         | GI      |
|                    |      |      | 10          | Ofoxacin      | 1-8        | 1-8        | GI      |
| Tjiam et al.       | 1986 | (52) | 12          | Ciprofloxacin | 0,125-2    | 0,25-4     | IF      |
| Bowie              | 1986 | (6)  | 10          | Norfloxacin   | 32         | 32         | IF      |
|                    |      |      | 10          | Ofoxacin      | 1          | 1          | IF      |
| Rettig et al.      | 1986 | (36) | 7           | Norfloxacin   | 4-16       |            | LU      |
|                    |      |      | 11          | Ciprofloxacin | 1-4        |            | LU      |
|                    |      |      | 11          | Ofoxacin      | 0,5-2      |            | LU      |

IF = Immunfluoreszenz; GI = Giemsaefärbung; LU = Lugolfärbung;

| Antibiotikum  | Serum |                  |              | Kantharidinblase |                  |              | Urin |
|---------------|-------|------------------|--------------|------------------|------------------|--------------|------|
|               | tmax  | cmax             | t1/2 $\beta$ | tmax             | cmax             | t1/2 $\beta$ |      |
|               | (h)   | $\mu\text{g/ml}$ | (h)          | (h)              | $\mu\text{g/ml}$ | (h)          |      |
| Ofloxacin     | 1.2   | 10.7             | 39           | 5.3              | 5.2              | 8.0          | 141  |
| 1x600 mg p.o. |       |                  |              |                  |                  |              |      |
| Ciprofloxacin | 1/2   | 2.3              | 7.0          | 2.6              | 1.4              | 5.6          | 500  |
| 1x500 mg p.o. |       |                  |              |                  |                  |              |      |

Tab. 11: Pharmakokinetische Daten von Ofloxacin und Ciprofloxacin (nach Wise et al. (54))

Verglichen mit den MHK- und MBK-Werten für Tetrazyklin und Erythromycin liegen die Werte für Ofloxacin und Ciprofloxacin etwa eine Zehnerpotenz höher. Zieht man zu den MHK- und MBK-Werten (s. Tab. 10) pharmakokinetische Daten in Betracht (s. Tab. 11), so lassen Ofloxacin und Ciprofloxacin nicht unbedingt überragende Therapieerfolge erwarten. Entscheidend neben den mikrobiologischen und pharmakokinetischen Daten sind aber die Ergebnisse der klinischen Versuche. Studien mit 250 bzw. 500 mg-Einzeldosen Ciprofloxacin zur Therapie einer gonorrhoeischen Infektion vermochten eine gleichzeitige Chlamydieninfektion nicht zu eliminieren (14,27). Dieses Ergebnis ist an sich nicht überraschend, dauert doch ein Vermehrungszyklus von Chlamydia trachomatis mindestens 48-72 Std. Es erscheint damit abwegig, mit einer Einzeldosis irgend eines Antibiotikums einen Erfolg sehen zu wollen. Erst eine Mindesttherapiedauer von einer Woche mit mehrmaligen täglichen Dosen von z.B. 500 bzw. 750 mg Ciprofloxacin gewährt Therapieerfolge von etwa 80 %, wie sie für die Standardtherapie mit Tetrazyklin oder Erythromycin üblich sind. Dies geht aus den wenigen und lückenhaften Studien jedenfalls hervor (s. Tab. 12).

Bei der Betrachtung neuerer Gyrasehemmer darf auch ihre Wirkung auf Mycoplasma hominis und Ureaplasma urealyticum nicht außer Acht gelassen werden, sind doch diese Erreger gelegentlich an Urogenitalinfektionen beteiligt (s. Tab. 13)

Tab. 12: Ergebnisse von Therapiestudien mit Gyrasehemmern bei Chlamydia trachomatis Infektionen

| Autor             | Jahr | Ref. | Anz. Pat. | Therapieprotokoll | Kontrolle n. 1-2 Wo.<br>bakt./ klin. Heilung | Kontrolle n. 4-12 Wo.<br>bakt./ klin. Heilung |
|-------------------|------|------|-----------|-------------------|----------------------------------------------|-----------------------------------------------|
| Felmingham et al. | 1985 | (12) |           | Ciprofloxacin     |                                              |                                               |
|                   |      |      | 11        | 2x500 mg 7 T.     | 74 %                                         | 28 %                                          |
|                   |      |      | 11        | 3x500 mg 7 T.     | 90 %                                         | 90 %                                          |
| Fischer-Brügge    | 1985 | (13) |           | Ciprofloxacin     |                                              |                                               |
|                   |      |      | 6         | 2x500 mg 1 T.     | 17 %                                         | 17 %                                          |
|                   |      |      | 10        | 2x750 mg 5 T.     | 60 %                                         | 60 %                                          |
|                   |      |      | 11        | 2x500 mg 10 T.    | 82 %                                         | 82 %                                          |
| Fong et al.       | 1986 | (15) |           | Ciprofloxacin     |                                              |                                               |
|                   |      |      | 26        | 2x750 mg 7 T.     |                                              | 65 %                                          |
| Bowie et al.      | 1986 | (7)  |           | Norfloxacin       |                                              |                                               |
|                   |      |      | 25        | 2x400 mg 10 T.    | 16 %                                         | 24 %                                          |
|                   |      |      |           | Ciprofloxacin     | 8 %                                          | 4 %                                           |
| Arya et al.       | 1986 | (1)  |           | 3x500 mg 7 T.     | 45 %                                         | 30 %                                          |
|                   |      |      | 20        |                   |                                              | 15 %                                          |

|                | MHK für <u>M.hominis</u> | MHK für <u>U.urealyticum</u> |
|----------------|--------------------------|------------------------------|
|                | $\mu\text{g/ml}$         | $\mu\text{g/ml}$             |
| Oxytetracyclin | 0.5-4.0                  | 0.5-4.0                      |
| Ciprofloxacin  | 0.25-0.5                 | 0.25-1.0                     |
| Ofloxacin      | 0.125-2.0                | 1.0-4.0                      |

Tab. 13: Vergleichende In vitro-Wirksamkeit von Oxytetracyclin, Ciprofloxacin und Ofloxacin gegen Mycoplasma hominis und Ureaplasma urealyticum (2,52)

Im Gegensatz zu Ofloxacin und Ciprofloxacin zeigt Norfloxacin auf Chlamydia trachomatis eine völlig unzureichende Wirkung. MHK-Werte von 18  $\mu\text{g/ml}$  werden bisher von Gewebespiegeln nicht erreicht. Ein einziger klinischer Versuch ist demnach auch fehlgeschlagen (7).

Die Wirkung der Penizilline wurde lange Zeit kontrovers beurteilt, zumal zahlreiche klinische Berichte über Erfolge in der Behandlung nichtgonorrhöischer bzw. chlamydienbedingter Urethritiden und Zervizitiden vorliegen (31). Leider existieren zu diesen Berichten nicht die entsprechenden Nachuntersuchungen, die bei derartigen Infektionen gefordert werden müssen. Lange bekannt ist der Effekt von Penicillin G und Ampicillin auf licht- und elektronenmikroskopisches Aussehen von Chlamydia trachomatis Kulturen. Bereits geringe Konzentrationen verursachen eine Hemmung der Ausreifung normaler Einschlußkörper. Stattdessen kann man unreife blasig aufgetriebene Strukturen erkennen, die Retikularkörperchen entsprechen. Nach Entfernen des Antibiotikums gewinnen diese Gebilde wieder die normale Form von Einschlußkörpern zurück und werden infektiös. Der Effekt von Penizillinen ist umso unerklärlicher, als bisher in Zellwänden von Chlamydien keine Mureinsynthese - der Angriffspunkt der Penizilline - nachgewiesen werden konnte. Es gilt nun als gesichert, daß Penizilline Infektionen mit Chlamydia trachomatis für die Dauer der Behandlung lindern können. Die Infektion besteht jedoch fort und schon bald nach Behandlungsende flammen die Beschwerden wieder auf. Über häufige Therapieversager wird in der

Literatur berichtet (34).

Als fast völlig wirkungslos erwies sich Ceftizoxim. Erst eine Konzentration von 1 mg/ml erbrachte einen dem der Penizilline ähnlichen Effekt.

Die am Stamm 3917 für die Antibiotika Ofloxacin und Tetrazyklin dargestellte Kinetik zeigt den typischen Effekt von Chemotherapeutika auf das chlamydiale Wachstum. Bereits bei einer sehr niedrigen Konzentration und innerhalb eines recht engen Bereichs werden die meisten Einschlußkörper (ca. 99%) gehemmt. Das restliche Prozent benötigt eine etwa doppelt so hohe Konzentration an Wirksubstanz. Dieses Verhalten könnte Latenz und Persistenz chlamydialer Infektionen erklären.

## E. Zusammenfassung:

Von 120 Chlamydia trachomatis Stämmen, die im Rahmen klinischer Routineuntersuchungen isoliert wurden, konnten 35 Stämme in cycloheximidbehandelten McCoy Zellen vermehrt und permanent subkultiviert werden.

Bei diesen Stämmen wurden in Zellkulturen die In vitro-Empfindlichkeit (minimale Hemmkonzentration, MHK und minimale bakterizide Konzentration, MBK) gegen die Antibiotika Tetrazyklin-HCl, Erythromycin, Ciprofloxacin und Ofloxacin ermittelt. Die gefundenen Werte für Tetrazyklin (MHK: 0.03-0.08 µg/ml; MBK: 0.1-1.0 µg/ml), für Erythromycin (MHK: 0.04-0.08 µg/ml; MBK: 0.4-2.0 µg/ml), Ciprofloxacin (MHK: 0.9-2.0 µg/ml; MBK: 1.0-6.0 µg/ml) und Ofloxacin (MHK: 0.5-3.0 µg/ml; MBK: 3.0-6.0 µg/ml) wurden mit den bisher bekannten Werten der Literatur verglichen. Im vergleichsweise umfangreichen Untersuchungsmaterial (35 Stämme) fand sich kein wirklich resistenter Erreger.

Zum Nachweis von Chlamydia trachomatis diente eine Fluoresceinmarkierter monoklonaler Antikörper. Diese Methode erwies sich als empfindlicher als herkömmliche Färbemethoden.

Ofloxacin und Ciprofloxacin verhielten sich in ihrer Wirksamkeit gegenüber Chlamydia trachomatis recht ähnlich, wenngleich Ofloxacin als die geringfügig wirksamere Substanz betrachtet werden darf. Verglichen mit den Standardtherapeutika sind die MHK- und MBK-Werte jedoch um den Faktor 5-10 höher.

Unter Berücksichtigung pharmakokinetischer Daten rechtfertigen die gefundenen In vitro-Werte eine eingehendere klinische Prüfung. Die bisherigen Versuche dazu waren ermutigend, vorausgesetzt die Therapie wurde ausreichend lange (mindestens 7 Tage) durchgeführt und die Dosierung hoch genug gewählt.

## E. Literaturverzeichnis:

- 1 Arya, O.P., D.Hobson, C.A.Hart, C.Bartzokas & B.C.Pratt (1986): Evaluation of Ciprofloxacin 500 mg twice daily for one week in treating uncomplicated gonococcal, chlamydial, and non-specific urethritis in men. Genitourin.Med. 62, 170-174.
- 2 Aznar, J., M.C.Caballero, M.C.Lozano, C.De Miguel, J.C.Palomares & E.J.Perea (1985): Activities of new quinoline derivatives against genital pathogens. Antimicrob.Agents Chemother. 27, 76-78.
- 3 Bailey, J.M.G., C.Heppleston & S.J.Richmond (1984): Comparison of the In vitro activities of Ofloxacin and Tetracycline against Chlamydia trachomatis as assessed by indirect immunofluorescence. Antimicrob.Agents Chemother. 26, 13-16.
- 4 Bowie, W.R., C.K.Lee & E.R.Alexander (1978): Prediction of efficacy of antimicrobial agents in treatment of infections due to Chlamydia trachomatis. J.Infect.Dis. 138, 655-659.
- 5 Bowie, W.R. (1980): In vitro activity of Rosaramicin against Chlamydia trachomatis. Antimicrob.Agents Chemother. 18, 978-979.
- 6 Bowie, W.R. (1986): In vitro activity of newer Quinolones, Macrolides, and Clavulanic acid against Chlamydia trachomatis. In: Oriel D., G.Ridgway, J.Schachter, D.Taylor-Robinson, M.Ward (eds.): Chlamydal infections. Cambridge University Press, Cambridge, pp 524-527.
- 7 Bowie, W.R., V.Willets & L.Sibau (1986): Failure of Norfloxacin to eradicate Chlamydia trachomatis in nongonococcal urethritis. Antimicrob.Agents Chemother. 30, 594-597.
- 8 Centers for Disease Control (1985): Chlamydia trachomatis infections. Policy guidelines for prevention and control.

- 9 Cevenini,R.,V.Sambri & M.LaPlaca (1986): Comparative In vitro activity of RU 28965 against Chlamydia trachomatis. Eur.J Clin.Microbiol. 5, 598-600.
- 10 Csángó,P.A.,T.Gundersen & G.Anestad (1982): Double-blind comparison of Erythromycin and Doxycycline therapy for nongonococcal urethritis. In: Mardh P.A.,K.K.Holmes,J.D.Oriel, P.Piot,J.Schachter (eds): Chlamydial infections. Elsevier Biomedical Press, pp 257-261.
- 11 Darne,J.F.,G.L.Ridgway & J.D.Oriel (1982): Rosaramicin and Tetracycline in the treatment of nongonococcal urethritis. Br.J.Vener.Dis. 58, 117-120.
- 12 Felmingham,D.,J.D.Oriel & G.L.Ridgway (1985): In vitro activity of Ciprofloxacin against pathogens of the genitourinary tract and efficacy in the treatment of gonococcal infections and nongonococcal urethritis. In: Neu H.C.,H.Weuta (eds.): First international Ciprofloxacin workshop, Proceedings Excerpta medica, Current clinical practice series 34, Leverkusen, pp 342-345.
- 13 Fischer-Brügge,U. (1985): Efficacy and safety of Ciprofloxacin in nongonococcal urethritis. In: Neu H.C.,H.Weuta (eds.): First international Ciprofloxacin workshop, Proceedings Excerpta medica, Current clinical practice series 34, Leverkusen, pp 330-332.
- 14 Fong,I.W.,W.Linton,M.Simbul,B.McLaughlin & V.Rahn (1985): Clinical efficacy of Ciprofloxacin versus Doxycycline in nongonococcal urethritis: a preliminary report. In: Neu H.C., H.Weuta (eds.): First international Ciprofloxacin workshop, Proceedings Excerpta medica, Current clinical practice series 34, Leverkusen, 333-332.
- 15 Fong,I.W.,E.W.Hook & W.E.Stamm (1986): Recent clinical

- trials in chlamydial infections: The value of quinolones. Infect.Med.Dis.Lett.Obstetr.Gynecol. 8 (Suppl.), 41-47.
- 16 Hart,C.A.,S.J.How & D.Hobson (1984): Activity of Ciprofloxacin against genital tract pathogens. Br,J.Vener.Dis. 60, 316-318.
  - 17 Heessen,F.W.A. & H.L.Muytjens (1984): In vitro activities of Ciprofloxacin, Norfloxacin, Pipemidic acid, Cinoxacin and Nalidixic acid against Chlamydia trachomatis. Antimicrob.Agents Chemother. 25, 123-124.
  - 18 Holmes,K.K.,H.H.Handsfield,S.P.Wang,B.B.Wentworth, M.Turck, J.B.Anderson & E.R.Alexander (1975): Etiology of nongonococcal urethritis. N.Engl.J.Med. 292, 1199-1205.
  - 19 Hunter,J.M. & R.G.Sommerville (1984): Erythromycin stearate in treating chlamydial infection of the cervix. Br.J.Vener.Dis. 60, 387-389.
  - 20 Hoyme U.B.(1986): Chlamydieninfektionen in Gynäkologie und Geburtshilfe. Fortschr.Med. 104, 613-616.
  - 21 How ,S.J.,D.Hobson,C.A.Hart & E.Quayle (1985): A comparison of the In vitro activity of antimicrobials against Chlamydia trachomatis examined by Giemsa and a fluorescent antibody stain. J.Antimicrob.Chemother. 15, 399-404.
  - 22 Johannisson,G.,A.Sernryd & E.Lycke (1979): Susceptibility of Chlamydia trachomatis to antibiotics In vitro and In vivo. Sex.Transm.Dis. 6, 50-57.
  - 23 Keshishyan,H.,L.Hanna & E.Jawetz (1973): Emergence of Rifampin-resistance in Chlamydia tracomatis. Lancet 244, 173-174.
  - 24 Kucers A. & N.McK.Bennett (1979): The use of antibiotics. William Heinemann Medical Books, London.

- 25 Kuo,C.C.,S.P.Wang & J.T.Grayston (1977): Antimicrobial activity of several antibiotics and a sulfonamide against Chlamydia trachomatis organisms in cell culture. Antimicrob.Agents Chemother. 12, 80-83.
- 26 Lassus,A.,C.Allgulander & T.Juvakoski (1982): Efficacy of Rosaramicin and Tetracycline in Chlamydia-positive and -negative nongonococcal urethritis. Eur.J.Sex.Transm.Dis. 1, 29-31.
- 27 Loo,P.S.,G.L.Ridgway & J.D.Oriel (1985): Single dose Ciprofloxacin in the treatment of gonococcal infections in men. Genitourin.Med. 61, 51-55.
- 28 Mardh,P.A.,T.Ripa,L.Svensson & L.Weström (1977): Chlamydia trachomatis infection in patients with acute salpingitis. N.Engl.J.Med. 296, 1477-1379.
- 29 Meier-Ewert,H.,G.Weil & G.Millot (1983): In vitro activity of Norfloxacin against Chlamydia trachomatis. Eur.J.Clin.Microbiol. 2, 271.
- 30 Meier-Ewert,H.,G.Weil & G.Millot (1984): In vitro activity of Ciprofloxacin against clinical isolates of Chlamydia trachomatis. Eur.J.Clin.Microbiol. 3, 372.
- 31 Møller,B.R.,M.Cramers & E.From (1985): Pivampicillin in treating genital infection with Chlamydia trachomatis. Genitourin.Med. 61, 264-265.
- 32 Mourad,A.,R.L.Sweet,N.Sugg & J.Schachter (1980): Relative resistance to Erythromycin in Chlamydia trachomatis. Antimicrob.Agents Chemother. 18, 696-698.
- 33 McNeil,P.J.,N.J.Fiumara,J.J.Caliando,S.Benes & W.M.McCormack (1981): Evaluation of Doxycycline hyclate in the treatment of nongonococcal urethritis. Sex.Transm.Dis. 8, 127-131.

- 34 Oriel, J.D., G.L.Ridgway, P.Reeve, D.C.Beckingham & J.Owen (1976): The lack of effect of Ampicillin plus Probenecid given for genital infections with Neisseria gonorrhoeae on associated infections with Chlamydia trachomatis. J.Infect.Dis. 133, 568-571.
- 35 Oriel, J.D. & G.L.Ridgway (1982): Studies of epidemiology of chlamydial infection of the human genital tract. In: Mardh P.A., K.K.Holmes, J.D.Oriel, P.Piot, J.Schachter (eds.): Chlamydial infections, Elsevier Biomedical Press, Amsterdam, pp.425-428.
- 36 Rettig, P.J., W.J.Rollerson & M.I.Marks (1986): In vitro activity of six fluoroquinolones against Chlamydia trachomatis. In: Oriel D., G.Ridgway, J.Schachter, D.Taylor-Robinson, M.Ward (eds.): Chlamydial infections. Cambridge University Press, Cambridge, pp 528-531.
- 37 Ridgway, G.L., J.M.Owen & J.D.Oriel (1976): A method for testing the antibiotic susceptibility of Chlamydia trachomatis in a cell culture system. J.Antimicrob.Chemother. 2, 71-76.
- 38 Ridgway, G.L., J.M.Owen & J.D.Oriel (1978): The antimicrobial susceptibility of Chlamydia trachomatis in cell culture. Br.J.Vener.Dis. 54, 103-106.
- 39 Ridgway, G.L., G.Mumtaz, F.G.Gabriel & J.D.Oriel (1984): The activity of Ciprofloxacin and other 4-quinolones against Chlamydia trachomatis and Mycoplasmas In vitro. Eur.J.Clin.Microbiol. 3, 344-346.
- 40 Ridgway, G.L.(1986): Antimicrobial chemotherapy of chlamydial infections: where next? Eur.J.Clin.Microbiol. 5, 550-553.
- 41 Ripa, K.T. & P.A.Mardh (1977): Cultivation of Chlamydia trachomatis in cycloheximide-treated McCoy cells. J.Clin.Microbiol. 6, 328-331.

- 42 Rumpianesi, F., V. Sambri, S. Bertini, I. Tamba & R. Cevenini (1984): In vitro activity of Ciprofloxacin against Chlamydia trachomatis and Ureaplasma urealyticum. Chemioterapia 3, 173-174.
- 43 Sande, M.A. & G.L. Mandell (1980): Antimicrobial agents: Tetracyclines and chloramphenicol. In: Goodman Gilman A., Goodman L.S., Gilman A. (eds.): Goodman and Gilman's the pharmacological basis of therapeutics. MacMillan Publishing Co, New York, pp. 1181-1199.
- 44 Schachter, J. (1978): Chlamydial infections. N.Engl.J.Med. 298, 428-435; 490-495; 540-549.
- 45 Schachter, J. & F. Gschnait (1985): Chlamydieninfektionen. Z.Hautkr. 60, 1472-1485.
- 46 Schachter, J. (1986): Biology of Chlamydia trachomatis. In: Holmes K.K., P.A. Mardh, P.F. Sparling, P.J. Wiesner (eds.): Sexually transmitted diseases. McGraw Book Company, New York. pp. 243-257.
- 47 Scheibel, J.H., J.K. Kristensen, B. Hentzer, L. Secher, S. Ullman, J. Verdich & K. Weismann (1982): Treatment of chlamydial urethritis in men and Chlamydia trachomatis-positive female partners: Comparison of Erythromycin and Tetracycline in treatment courses of one week. Sex. Transm. Dis. 9, 128-131.
- 48 Smith, T.F. (1977): Comparative recoveries of Chlamydia from urethral specimens using glass vials and plastic microtiter plates. Am.J.Clin.Pathol. 67, 496-498.
- 49 Smith, T.F. & H.E. Washton (1978): In vitro susceptibility to 30 strains of Chlamydia trachomatis to Rosamicin. Antimicrob. Agents Chemother. 14, 493-494.
- 50 Taylor-Robinson, D. & B.J. Thomas (1980): The role of Chlamy-

dia trachomatis in genital tract and associated diseases.  
J.Clin.Pathol. 33, 205-233.

- 51 Tegelberg-Stassen, M.J.A.M., J.C.S. van der Hoek, L.Mooi, J.H.T.Wagenvoort, T. van Joost, M.F. Michel & E. Stolz (1986): Treatment of uncomplicated gonococcal urethritis in men with two dosages of Ciprofloxacin. Eur.J.Clin.Microbiol. 5, 244-246.
- 52 Tjiam, K.H., J.H.T.Wagenvoort, B. van Klingereren, P. Piot, E. Stolz & M.F. Michel (1986): In vitro activity of the two new 4-quinolones A 56619 and A 56620 against Neisseria gonorrhoea, Chlamydia trachomatis, Mycoplasma hominis, Ureaplasma urealyticum and Gardnerella vaginalis. Eur.J.Clin.Microbiol. 5, 498-501.
- 53 Wise, R., J.M. Andrews & L.J. Edwards (1983): In vitro activity of Bay 09867, a new quinolone derivative compared with those of other antimicrobial agents. Antimicrob. Agents Chemother. 23, 559-564.
- 54 Wise, R., D. Lister, C.A.M. McNulty, D. Griggs & J.M. Andrews (1986): The comparative pharmacokinetics of five quinolones. J. Antimicrob. Chemother. 18, 71-81.
- 55 Zapata, M., M. Chernesky & J. Mahony (1984): Indirect immunofluorescence staining of Chlamydia trachomatis in microculture plates with monoclonal antibodies. J.Clin.Microbiol. 19, 937-939.

## Lebenslauf

Name: Anton Hartinger

geboren am: 7.12.1949

in: München

Schule: 1956-1962 Volksschule in Finsing  
1962-1971 Human. Gymnasium in Scheyern  
1971 Abitur am Schyrengymnasium in Pfaffenhofen/Ilm

Studium: 1971 Medizin und Biologiestudium an der LMU-München  
1977 Diplomprüfung in Biologie  
1984 Dritter Abschnitt der ärztlichen Prüfung und Approbation als Arzt  
1985 Promotion zum Dr. rer. nat. an der TU München

Ersatzdienst: Mai 1977 bis April 1978 am Institut für chirurgische Forschung der LMU München

Berufstätigkeit: Wissenschaftlicher Angestellter am Institut für Mikrobiologie der TU München von Mai 1978 bis April 1983  
Seit Mai 1984 Assistenzarzt am Institut für Mikrobiologie, Immunologie und Krankenhaus-hygiene des Städtischen Krankenhauses München-Bogenhausen



Herrn Prof. Dr.med. Dr.h.c. O. Braun-Falco möchte ich für die Überlassung des Themas meinen Dank aussprechen.

Für die Betreuung und Durchsicht der Arbeit sowie für die gute Zusammenarbeit bedanke ich mich sehr herzlich bei Priv.-Doz. Dr.med. H.C. Korting.

Herrn Dr.med. H. Blaufuß danke ich für die großzügige Unterstützung, ohne die diese Arbeit nicht möglich gewesen wäre.

Für das Schreiben der Arbeit danke ich Frau Dr. Michaela Baumann.









# **D. GRÄBNER**

Dissertations- u. Offsetdruckerei

Gotenstraße 3

8602 Allendorf bei Bamberg

Telefon 09545 / 8791

